

Aus der Hautklinik der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Leitung: Prof. Dr. med. G.W. Korting

UNTERSUCHUNGEN ZUR
FRAKTIONIERTEN PORPHYRINBESTIMMUNG
IM URIN

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
dem Fachbereich Medizin vorgelegt

von Burkhard Wendt
aus Darmstadt

Mainz 1980

Aus der Hautklinik der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Leitung: Prof. Dr. med. G.W. Korting

UNTERSUCHUNGEN ZUR
FRAKTIONIERTEN PORPHYRINBESTIMMUNG
IM URIN

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
dem Fachbereich Medizin vorgelegt

von Burkhard Wendt
aus Darmstadt

Mainz 1980



Dekan : Professor Dr. med. H. Leithoff

1. Gutachter : Professor Dr. rer. nat. B. Morsches

2. Gutachter : Professor Dr. med. G.W. Korting

Tag der mündlichen Prüfung : 12. November 1980

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Chemie und Biochemie der Porphyrine	1
1.2	Störungen des Porphyrinstoffwechsels	5
1.3	Quantitative Bestimmung von Porphyrinen im Urin	9
2.	PROBLEMSTELLUNG	13
3.	MATERIAL UND METHODIK	14
3.1	Material	14
3.1.1	Geräte	14
3.1.2	Reagenzien	14
3.2	Trennung der Urinporphyrine mit Dünnschichtchromatographie nach DOSS	14
3.2.1	Arbeitsvorschrift für die Urinanalyse	14
3.2.2	Ausführung der Wiederfindungsversuche	19
3.2.3	Quantitative Untersuchungen zur Elution der Porphyrinmethylester von der Dünnschichtplatte	22
3.3	Trennung der Uroporphyrinmethylester I und III durch Dünnschichtchromatographie	22
3.3.1	Arbeitsvorschrift für die Urinanalyse	23
3.3.2	Gewinnung von Uroporphyrin-III- oktamethylester	25
3.3.3	Ausführung der quantitativen Untersuchungen zur Effektivität der Isomerentrennung	26
3.4	Trennung der Urinporphyrine mit Florisil-Säulen (modifiziert nach SCHWARTZ et al.)	26
3.4.1	Arbeitsvorschrift für die Urinanalyse	27

3.4.2	Vorversuch zur Bestimmung der optimalen Elutionsmittelmenge	31
3.4.3	Vorversuch: Extinktion der Porphyrine in verschiedenen Elutionsmittel-Salzsäure-Gemischen	31
3.4.4	Variation der Probenmenge	34
3.4.5	Ausführung der Wiederfindungsversuche	34
4.	ERGEBNISSE	35
4.1	Trennung der Urinporphyrine durch Dünnschichtchromatographie nach DOSS	35
4.1.1	Qualität der Trennung	35
4.1.2	Urinanalyse von Patienten mit Porphyria cutanea tarda	35
4.1.3	Absorptionsmaxima	36
4.1.4	Wiederfindungsversuche	36
4.1.5	Versuche zur Verbesserung der Elution der Porphyrine	38
4.1.6	RF-Werte	38
4.2	Trennung der Uroporphyrinmethylester-Isomere I und III	39
4.3	Trennung der Urinporphyrine mit Florisil-Säulen	41
4.3.1	Elution der Porphyrine	41
4.3.2	Extinktion der Porphyrine in NH_4OH -Aceton-HCl-Lösungen	43
4.3.3	Einfluß der Salzsäureverdünnung auf die Extinktion der porphyrinhaltigen Eluate	43
4.3.4	Einfluß der Probenmenge	47
4.3.5	Wiederfindungsversuche	48
4.3.6	Urinanalyse von Patienten mit Porphyria cutanea tarda	48
5.	DISKUSSION	50
5.1	Trennung der Porphyrine durch Dünnschichtchromatographie nach DOSS	50

5.1.1	Der systematische Fehler der Methode	50
5.1.2	Spezifität der Methode	51
5.1.3	Anwendung der Methode in der Diagnostik der Porphyrinstoffwechselstörungen	53
5.2	Trennung der Uroporphyrinisomere I und III durch Dioxan-Chromatographie nach FALK und BENSON	54
5.3	Trennung der Porphyrine mit Florisil-Säulen	56
5.3.1	Anpassung der Methode an die Spektralphotometrie	56
5.3.2	Probleme der spektralphotometrischen Bestimmung	59
5.3.3	Wiederfindung	59
5.3.4	Elutionsmittelmengen	60
5.3.5	Änderung des Absorptionsmaximums der Porphyrine durch Ansäuerung der Meßlösung	61
5.4	Vergleich der Florisil-Methode (3.4.1) mit der DC-Methode nach DOSS (3.2.1)	61
5.4.1	Prinzipielle Unterschiede - Grenzen der Vergleichbarkeit	61
5.4.2	Durchführung	62
5.4.3	Wiederfindung	62
5.4.4	Wert der Methoden in der Differential- diagnostik der Porphyrinen	63
6.	ZUSAMMENFASSUNG	64
7.	ANHANG	66
8.	LITERATURVERZEICHNIS	76

1. EINLEITUNG

1.1 Chemie und Biochemie der Porphyrine

(Literatur: 2, 40, 45, 48, 53, 60, 78, 79)

Das chemische Grundgerüst der Porphyrine ist das Porphin. Dieses besteht aus vier Pyrrolkernen, die durch Methinbrücken verbunden sind (Abb. 1).

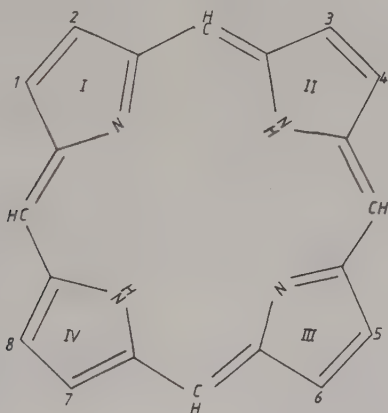
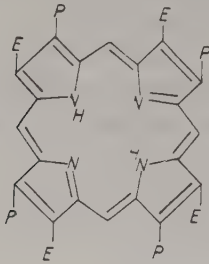


Abb. 1 Strukturformel des Porphins. Die arabischen Ziffern (1-8) bezeichnen die freien Wasserstoffatome. Mit römischen Ziffern (I-IV) werden die Pyrrolringe numeriert.

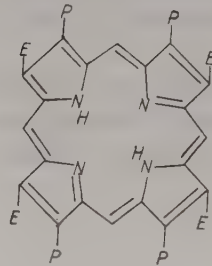
Durch Substitution der Wasserstoffatome 1-8 an den Pyrrolringen entstehen die Porphyrine. Als Substituenten kommen vor allem Methyl-, Vinyl-, Azetat- und Propionatrete in Frage.

Wichtig ist die Kenntnis der Isomeriemöglichkeiten der Porphyrine. Kommen in einem Porphyrin-Molekül zwei Substituenten je vier mal vor, wie das bei den medizinisch

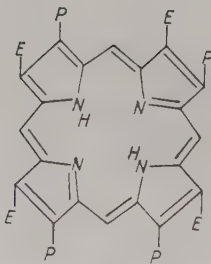
wichtigsten Porphyrinen der Fall ist, so sind vier Isomere möglich (Abb. 2).



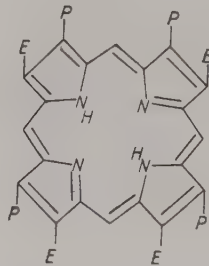
2 a



2 b



2 c



2 d

Abb. 2 Die Uroporphyrin-Isomere.

2a: Uroporphyrin I

2b: Uroporphyrin II

2c: Uroporphyrin III

2d: Uroporphyrin IV

E = Essigsäurerest

P = Propionsäurerest

Die Biosynthese der Porphyrine läuft sowohl im Mikroorganismus als auch im pflanzlichen und tierischen Organismus ab. Diese ubiquitäre Verbreitung der Porphyrine zeigt die Bedeutung dieser Stoffklasse für die gesamte belebte Natur. Als Metallporphyrine an Proteine

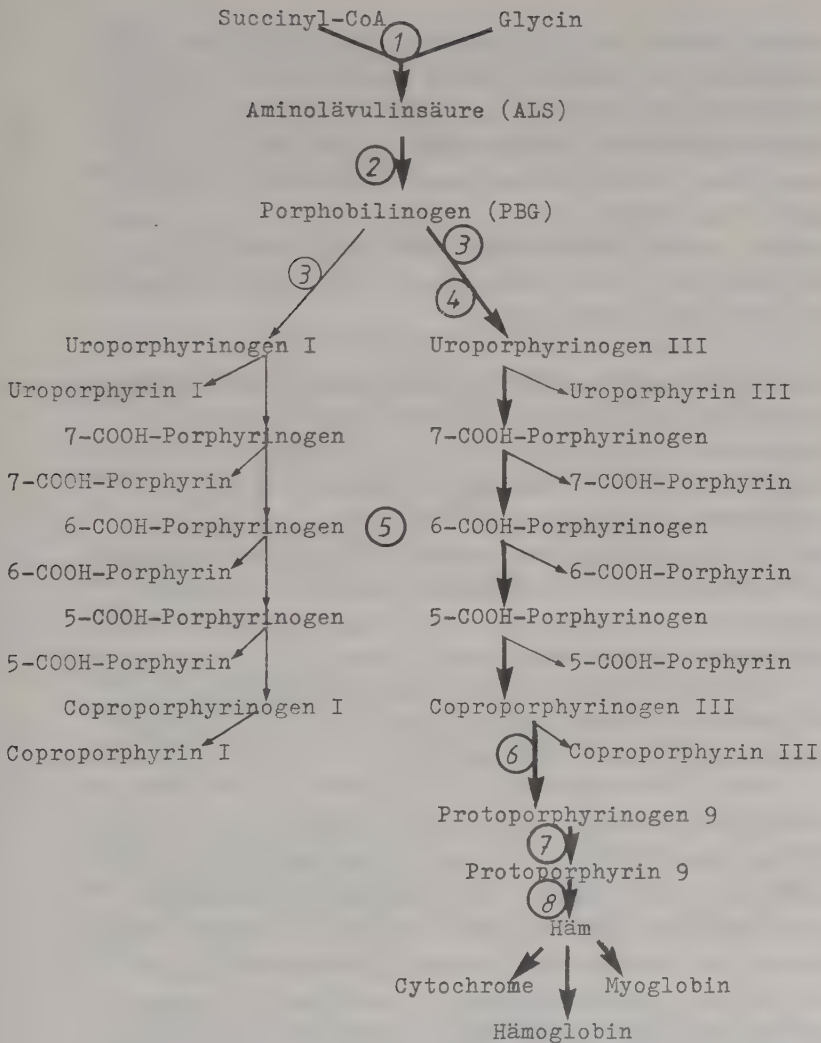


Abb. 3

Biosynthese der Porphyrine

Die Zahlen stehen für Enzyme: 1=ALS-Synthase, 2=ALS-Dehydrase, 3=Uroporphyrinogen-Synthase, 4=Uroporphyrinogen-Cosynthase, 5=Uroporphyrinogen-Decarboxylase, 6=Coproporphyrinogen-Oxydase, 7=Protoporphyrinogen-Oxydase, 8=Ferrochelatase

gebunden nehmen sie eine zentrale Stellung im Stoffwechsel ein: Chlorophyll ist in der pflanzlichen Zelle zur Photosynthese notwendig, während Häm im tierischen Organismus beim Sauerstofftransport erforderlich ist. Neben diesen beiden bekanntesten Porphyrinen gibt es jedoch eine Anzahl weiterer Porphyrine, die als Katalysatoren vieler Reaktionen für den Organismus unentbehrlich sind, z.B. als prosthetische Gruppe von Cytochromen in der Atmungskette.

Die Ausgangsprodukte für die Biosynthese der Porphyrine sind die Aminosäure Glycin und das dem Zitratzyklus entstammende Succinyl-CoA. Der Syntheseweg von diesen Ausgangsstoffen bis zum Häm ist bekannt und in Abb. 3 dargestellt. Wie aus diesem Schema ersichtlich ist, kann aus vier Molekülen Porphobilinogen sowohl Uroporphyrinogen I als auch Uroporphyrinogen III gebildet werden. Wir entnehmen Abb. 3 aber auch, daß nur Uroporphyrinogen III zur Hämsynthese verwendet wird. So ist es leicht verständlich, daß unter physiologischen Bedingungen das Verhältnis Uroporphyrinogen I zu Uroporphyrinogen III 1 zu 1000 beträgt.

Entscheidend für die Bildung von Uroporphyrinogen III ist das Enzym Uroporphyrinogen-Cosynthase (60), das in einem Teil der Literatur (40, 53) auch als Isomerase bezeichnet wird. Ist die Aktivität dieses Enzyms herabgesetzt (s. *Porphyria erythropoetica congenita*), so wird vermehrt Uroporphyrinogen I gebildet. Uroporphyrinogen I hat keine Funktion: Es wird zu Uroporphyrin I und Coproporphyrin I abgebaut und so ausgeschieden.

Auch die Hämvorstufen Uroporphyrinogen III und Coproporphyrinogen III werden zum Teil im Organismus zu den entsprechenden Porphyrinen oxidiert und mit Urin und

Faeces ausgeschieden. Dies trifft auch für die Porphyrinogene mit 7, 6 und 5 Carboxylgruppen zu, die bei der successiven Decarboxylierung von Uroporphyrinogen entstehen. Sie werden als Hepta-, Hexa- und Pentacarboxylporphyrin ausgeschieden.

1.2. Störungen des Porphyrinstoffwechsels

(Lit.: 7, 24-35, 40, 48, 53, 62, 74, 76, 95, 102)

Es wird zwischen Porphyrien und sekundären Porphyrinstoffwechselstörungen unterschieden. Unter Porphyrien versteht man Enzymstörungen der Porphyrinbiosynthese, die "zu einem eigenen, charakteristischen, aus der Porphyrinstoffwechselstörung resultierendem Krankheitsbild führen" (31). Bei den sekundären (symptomatischen) Porphyrinstoffwechselstörungen ist die erhöhte Porphyrinausscheidung Begleitsymptom einer Grunderkrankung (Beispiele s. Tab. 2).

Nach dem Ort der Störung werden die Porphyrien in zwei Gruppen eingeteilt: Liegt der Defekt in der Leberzelle, spricht man von hepatischer Porphyrie, liegt er im Erythroblasten, handelt es sich um eine erythropoetische Form. Je nachdem welcher Schritt der Porphyrinbiosynthese hauptsächlich gestört ist, ergeben sich unterschiedliche Krankheitsbilder und Laborbefunde, so daß mindestens sechs Porphyriefformen unterschieden werden müssen (S. Tab. 1 u. Tab. 3).

Ein auffallendes gemeinsames Merkmal aller Porphyrien mit Ausnahme der akuten intermittierenden ist die mehr oder weniger ausgeprägte Hautsymptomatik: Bei Sonnenbestrahlung kommt es zu Erythem und zu Blasenbildung. Die Ursache dafür ist die photosensibilisierende Wirkung der Porphyrine.

Auf die unterschiedlichen klinischen Bilder der Porphyrien kann in diesem Rahmen nicht eingegangen werden. Die wichtigsten Unterschiede sind in Tab. 3 zusammengefaßt.

Tab. 1 Postulierte Lokalisation der Enzymstörung
bei Porphyrien (Lit.: 34, 48, 53)

Porphyrie	Defektes Enzym
I. Erythroetische Porphyrien	
1. Porphyria congenita erythroetica	Uroporphyrinogen-Cosynthase (Isomerase) des Erythroblasten
2. Protoporphyrria erythroetica	?
II. Hepatische Porphyrien	
1. Porphyria acuta intermittens	Uroporphyrinogen-Synthase der Leberzelle
2. Porphyria cutanea tarda	Uroporphyrinogen-Decarboxylase der Leberzelle
3. Porphyria variegata	Ferrochelataase der Leberzelle
4. Coproporphyrria hereditaria	Coproporphyrinogen-Oxydase der Leberzelle

Tab. 2 Sekundäre (symptomatische) Porphyrinurien
(Lit.: 30, 31, 33, 40)

Bei folgenden Erkrankungen kann als Begleitsymptom eine erhöhte Porphyrinausscheidung im Urin beobachtet werden:

Leberparenchymschäden	: Zirrhose, Hepatitis, Fettleber, Alkoholleber- syndrom, Cholestase
Eisenstoffwechselstörungen	: Hämosiderose, Hämochromatose
Bluterkrankungen	: Anämien, Leukämien, Hämoblastosen, ineffektive Erythropoese
Heredit. Hyperbilirubinämie	: Dubin-Johnson-Syndrom, Rotor-Syndrom
Malignome	: Lebertumoren, Lymphogranulomatose, u.a.
Bes. Stoffwechsellagen	: Hungerzustand, Schwangerschaft, Diabetes mellitus
Intoxikationen	: Alkohol, Schwermetalle (insbes. Blei), andere Chemikalien

Tab. 3 Befunde bei verschiedenen Porphyriformen (Lit.: 23, 24, 32, 40, 48, 53)

	V	H	Porphyrin- Vorstufen	Urin-Befunde Porphyrine	Erythrozyten- porphyrine	Stuhl- porphyrine
I. Erythropoetische porphyrinen						
1. Porphyrria congenita erythropoetica	ar	+	n	U++ C+ (dabei 80% I-Isomere)	U++ C+ (ca. 80% I-Isom.)	U+ C+
2. Protoporphyrria erythropoetica	ad	+	n	n	P+++ C++ U+	P++ C+
II. Hepatische Porphyrrien						
1. Porphyrria acuta intermittens	ad	-	ALS++ PBG++	U+ 5+ C+ 7 u. 6 variabel	n	n
2. Porphyrria cutanea tarda		+	n	alle erhöht; charakterist. Verteilung: U: 45-80% 7: 15-35%	n	C+ (dauernd)
3. Porphyrria variegata	ad	+	ALS+ PBG+ nur bei neurolog. od. abd. Sympt.	U+ C+ nur im akuten Stadium	n	P++ C++ (dauernd)
4. Coproporphyrria hereditaria	ad	+	ALS+ PBG+ bei akutem Schub	C++ (dauernd)	n	C++ (dauernd)
Abkürzungen: V = Vererbungsmodus; H = Hautsymptome; PBG = Porphobilinogen; 5 = Pentacarboxylporphyrin; 6 = Hexacarboxylporphyrin; 7 = Heptacarboxylporphyrin; ar = autosomal-rezessiv; n = normal; U = Uroporphyrin; 6 = Hexacarboxylporphyrin; 7 = Heptacarboxylporphyrin; ad = autosomal-dominant; ALS = Aminolävulininsäure; C = Coproporphyrin;						

1.3 Quantitative Bestimmung von Porphyrinen im Urin

Die Ausscheidung der Porphyrine spiegelt das Verhalten der eigentlichen Metabolite, der Porphyrinogene, wider, so daß Störungen der Hämsynthese durch Bestimmung der Porphyrine in Blut, Urin und Faeces erfaßt werden können.

Zur quantitativen Bestimmung der Porphyrine sind zwei Verfahren gebräuchlich:

1. Spektralphotometrie: Dieses Verfahren beruht auf dem intensiven Absorptionsmaximum bei 400 nm (Soret-Gipfel).
2. Fluorometrie: Diese Methode basiert auf der starken Fluoreszenz, die bei Einwirkung von UV-Strahlung auftritt.

Beide Verfahren werden auch bei der Porphyrinbestimmung im Urin angewandt. Dies setzt jedoch eine vorherige Ausschaltung störender Begleitsubstanzen voraus.

Die Bestimmung der Porphyrine im Urin erfolgt entweder als Gesamtporphyrinbestimmung oder nach Fraktionierung des Porphyringemischs, das im Urin vorliegt. Natürlich ist die differentialdiagnostische Aussagekraft einer fraktionierten Porphyrinbestimmung wesentlich größer als die einer Gesamtporphyrinkonzentrationsbestimmung.

Bestimmung der Gesamtporphyrinkonzentration

Zur Bestimmung der Gesamtporphyrinkonzentration stehen zahlreiche Methoden zur Verfügung, die entweder auf der Fluoreszenzphotometrie (67,88) oder Absorptionsphotometrie (57,84,87,106) beruhen. Ist die Konzentration

der Gesamtporphyrine im Urin erhöht, so ist zur weiteren Diagnostik (vgl. Tab.3) eine fraktionierte Porphyrinbestimmung anzuschliessen.

Fraktionierte Porphyrinbestimmung

Bei der Fraktionierung des Porphyringemischs muß unterschieden werden zwischen Auftrennung des Porphyringemischs nach der Anzahl der Carboxylgruppen einerseits und der Auftrennung der Isomeren der Reihe I und III andererseits. Bei der Fraktionierung nach der Zahl der Carboxylgruppen begegnet man in der Literatur zwei grundsätzlich verschiedenen Möglichkeiten (Beide werden im experimentellen Teil untersucht):

1. Auftrennung des Porphyringemischs in chemisch definierte Porphyrine: Uro-, Heptacarboxyl-, Hexacarboxyl-, Pentacarboxyl- und Coproporphyrin.
Als Trennmethoden stehen hierfür zur Verfügung:
 - Papierchromatographie (50)
 - Dünnschichtchromatographie (3,12-18,21,22,41,75, 86,90,96)
 - Elektrophorese (8,10,47,52,56,66,92)
 - Extraktionschromatographie (71-73)
 - Flüssigkeitshochdruckchromatographie (4,43,54,65)
2. Auftrennung des Porphyringemischs in zwei Fraktionen:
Diese beiden Fraktionen werden in der entsprechenden Literatur als Uro- und Coproporphyrin bezeichnet. Diese Nomenklatur ist jedoch nicht ganz korrekt, da bei einer Auftrennung in nur zwei Fraktionen die Zwischenporphyrine (Hepta-, Hexa- und Pentacarboxylporphyrin) nicht verloren gehen, sondern sich auf beide Fraktionen verteilen. Diese Fraktionen stellen also Gemische mehrerer Porphyrine mit ähnlicher Car-

boxylgruppenzahl dar.

Eine derartige Bestimmung zweier Porphyrinfraktionen im Urin kann erfolgen durch:

- Extraktion (46,63,83)
- Säulenchromatographie (64,89,91)
- Derivativspektroskopie (5,59)

Durch Kombination von Extraktion und Bleiacetatfällung können drei Porphyrinfraktionen gewonnen werden (55): die ätherlöslichen Porphyrine (sog. Coproporphyrine), die äthylacetatlöslichen Porphyrine (sog. Waldenström-Porphyrin, ursprünglich als Uroporphyrin III bezeichnet (94)) und die nicht extrahierbaren Porphyrine (als Uroporphyrin I bezeichnet). Die chemische Zusammensetzung dieser Fraktionen ist von mehreren Autoren (6,38,55,56) untersucht worden, wobei keine einheitlichen Ergebnisse gefunden wurden. Vor allem die Zusammensetzung des Waldenström-Porphyrins ist starken Schwankungen ausgesetzt.

In der Literatur werden folgende Verfahren zur Uroporphyrin-Isomerentrennung angegeben:

- Papierchromatographie (44,50)
- Dünnschichtchromatographie (9,11)
- Säulenchromatographie (6)
- Extraktionschromatographie (70)
- Decarboxylierung (39,98-100) mit anschließender Trennung der erhaltenen Coproporphyrin-Isomere (42)
- Flüssigkeitshochdruckchromatographie (43,65)

Die Trennung der Uroporphyrin-Isomere gilt wegen deren Neigung zur Aggregatbildung (1,9,11) als besonders problematisch. Hier wird von der Flüssigkeitshochdruckchromatographie eine wesentliche Verbesserung erwartet (Ref. 26, S. 113).

Im Vergleich zur Uroporphyrin-Isomerentrennung bereitet die Trennung der Coproporphyrin-Isomere weniger Schwierigkeiten (70). Zu ihrer Durchführung stehen folgende Methoden zur Verfügung:

- Papierchromatographie (42)
- Dünnschichtchromatographie (58,61,86,90)
- Flüssigkeitshochdruckchromatographie (43,65)

Wie Mehrfachnennungen in den vorangegangenen Methodenübersichten zeigen, erlauben einige Verfahren gleichzeitig eine Isomerentrennung und eine Trennung nach Carboxylgruppenzahl, was natürlich vorteilhaft ist.

Die Lichtempfindlichkeit der Porphyrine ist bei den Laborarbeiten zu beachten: SCHMITT (87) fand in einem Urin, der drei Stunden der Tagesbeleuchtung ausgesetzt war, nur noch 30% des ursprünglichen Porphyringehaltes. Die Proben sind also möglichst vor Licht zu schützen.

2. PROBLEMSTELLUNG

Die Häufigkeit der Porphyrien hat in den letzten Jahren zugenommen (30,31). Auf der anderen Seite wurde die Porphyrie-Diagnostik durch Fortschritte in der Labormedizin verbessert (30). Diese Fortschritte betrafen auch die fraktionierte Porphyrinbestimmung im Urin, wie aus der Vielzahl der in den vergangenen Jahren veröffentlichten Methoden zu erkennen ist (vgl. Kapitel 1.3).

Deshalb soll es die Aufgabe der vorliegenden Arbeit sein, einige der erwähnten Methoden (Kap. 1.3) zu erproben. Bei der Auswahl der Methoden mußte natürlich die Ausstattung des Labors berücksichtigt werden, so konnten z.B. Versuche mit Flüssigkeitshochdruckchromatographie nicht durchgeführt werden.

Die zu untersuchenden Methoden sollen dabei unter folgender Fragestellung beobachtet werden:

1. Qualität der Porphyrinauftrennung
2. Qualität der quantitativen Bestimmung
(Richtigkeit der Methode)
3. Einfachheit der praktischen Durchführung
4. Zeitaufwand

3. MATERIAL UND METHODIK

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Spektralphotometer DMR 10 der Firma Zeiss

Wkf-Gefriertrocknungsanlage L 05

Universal-UV-Lampe der Firma Camag (Wellenlänge: 350 nm)

Zentrifuge

3.1.2 Reagenzien

Die in den Arbeitsvorschriften genannten Reagenzien wurden bei E. Merck, Darmstadt, bezogen mit folgenden Ausnahmen:

Kerosen purum bei Fluka, Buchs (Schweiz)

Die Porphyrintestsubstanzen bei Sigma Chemie, München

3.2 Trennung der Urinporphyrine mit Dünnschicht- chromatographie nach DOSS (12,15,17)

3.2.1 Arbeitsvorschrift für die Urinanalyse

Lyophilisierung, Veresterung und Extraktion

10 ml des gesammelten 24-Stunden-Urins werden gefriergetrocknet. Die lyophilisierte Probe wird mit 10 ml Methanol/H₂SO₄ (5 ml konz. H₂SO₄ in 95 ml Methanol) versetzt und für 30 min zur vollständigen Veresterung in einem Trockenschrank (35°C) aufbewahrt. Nach Zugabe von ca. 50 ml Aqua dest. werden die gebildeten Porphyrinmethylester viermal mit ca. 5 ml Chloroform ausgeschüttelt. Der Chloroformextrakt wird mit 5 ml wäßriger NaHCO₃ (50g/l) und 5 ml Aqua dest. gewaschen. Nach

Trocknen (mit wenig Na_2SO_4) wird der Chloroformextrakt filtriert und eingedampft.

Auftragen der Probe auf die DC-Platte

Der Rückstand wird in etwa 0,2 ml Chloroform wieder aufgelöst und mit einer Kapillarpipette auf die DC-Platte (Merck Kieselgel 60 F 254, 20 x 20 cm, Schichtdicke: 0,25 mm) aufgetragen, so daß eine schmale Startzone über die halbe Breite der Platte entsteht. Zweimal wird das Röhrchen, in dem die Probe eingedampft wurde, mit Chloroform nachgespült und die Chloroformlösung erneut auf die Startzone aufgetragen, um eine vollständige Überführung der Porphyrinmethylester zu erreichen. In Höhe der Startzone werden zusätzlich in Chloroform gelöste Porphyrinmethylester-Testsubstanzen punktförmig aufgetragen (Abb.4).

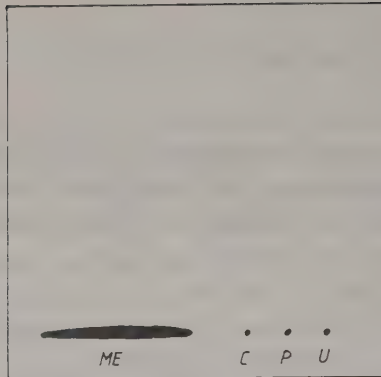


Abb.4 Auftragen der Probe und der Testsubstanzen auf die Kieselgelplatte

ME - Methylestermischung aus der Urinprobe,
C - Coproporphyrinmethylester,
P - Pentacarboxylporphyrinmethylester,
U - Uroporphyrinmethylester

Entwicklung des Chromatogramms

Die Entwicklung des Chromatogramms erfolgt aufsteigend, wobei nacheinander folgende Lösungsmittelsysteme verwendet werden:

1. Chloroform/Methanol 9:1 (V/V) Laufstrecke: 2 cm
2. Petroläther/Diäthyläther 1:1 (V/V) Laufstrecke: 15 cm
3. Benzol/Essigsäureäthylester/Methanol 85:13,5:1,5 (V/V) Laufstrecke: 10 cm

Zwischen den Entwicklungsstufen wird die Platte mit dem Föhn getrocknet. Das erste Lösungsmittelsystem dient

der Bildung einer schmalen Startzone, während im zweiten System störende Urinbestandteile von den Porphyrinen abgetrennt werden. Erst im dritten Lösungsmittelsystem werden die Porphyrinmethylester in 5 Fraktionen aufgetrennt: Uroporphyrin-ME, Heptacarboxylporphyrin-ME, Hexacarboxylporphyrin-ME, Pentacarboxylporphyrin-ME, Coproporphyrin-ME. (ME = Methylester)

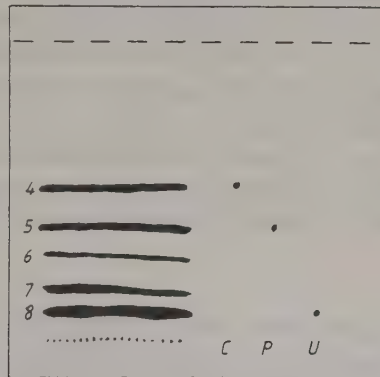


Abb. 5 Das entwickelte Chromatogramm unter UV-Licht
Die rotfluoreszierenden (porphyrinhaltigen)
Zonen sind dunkel wiedergegeben. Die Zahl am
Rand gibt die Zahl der Carboxylgruppen der je-
weiligen Porphyrine an.
Gepunktete Linie: Startzone. Getrichelte Linie:
Lösungsmittelfront.

Elution und quantitative Bestimmung

Nach der Entwicklung im dritten Lösungsmittelsystem
wird die noch feuchte Platte unter der UV-Lampe ($\lambda =$

350 nm) betrachtet. Die porphyrinhaltigen Zonen fluoreszieren dabei rot und werden mit einem Spatel markiert. Die einzelnen Porphyrinmethylester werden mit Hilfe der mitgelaufenen Testsubstanzen identifiziert. Sofern keine Testsubstanzen zur Verfügung stehen (Hepta- und Hexacarboxylporphyrin-ME) erfolgt die Identifizierung durch den RF-Wert, der mit steigendem Carboxylierungsgrad abnimmt. Die Porphyrinzonen werden mit einem Spatel abgeschabt und in je ein Reagenzglas (mit Schliffstopfen) überführt. Nach Zugabe von 5 ml Chloroform werden die Reagenzgläser 10 min maschinell geschüttelt, um die Porphyrinmethylester zu eluieren. Anschließend läßt man das Kieselgel auf den Boden des Gefäßes sinken. Nach einer Minute ist der Überstand so klar, daß ein Teil der überstehenden Chloroformlösung mit einer Pipette in eine Küvette (d=1cm) überführt werden kann.

Mit dem Spektralphotometer wird die Extinktion am Soret-Maximum gemessen. Die Berechnung des Porphyringehalts erfolgt mit den millimolaren Extinktionskoeffizienten (15) (Tab. 4).

Tab. 4 Extinktionskoeffizienten der Porphyrincarbon-säuremethylester in Chloroform (15).

Porphyrincarbon- säuremethylester	Copro	Penta	Hexa	Hepta	Uro
Extinktionskoeffizient					
$\epsilon_{\text{mmol}} \text{ (1/1mmol} \times \text{cm)}$	180	189	198	207	216

Die Porphyrinkonzentration der Meßlösung ist:

$$c = \frac{E}{\epsilon_{\text{mmol}} \times d}$$

E = Extinktion im Soret-Maximum,

ϵ_{mmol} = millimolarer Extinktionskoeffizient,

d = Schichtdicke in cm

Die Porphyrinausscheidung in 24 Stunden beträgt:

$$c_{24 \text{ h}} = \frac{E \times V_1 \times V_3}{\epsilon_{\text{mmol}} \times d \times V_2}$$

V_1 = Volumen des 24-Stunden-Urins,

V_2 = Volumen Urin zur Analyse,

V_3 = Volumen Chloroform zur Elution

3.2.2 Ausführung der Wiederfindungsversuche

Zur Überprüfung der Verlustraten der untersuchten Methode werden Porphyrinlösungen bekannter Konzentration benötigt. Hierzu wird zunächst eine Copro- und Uroporphyrinstammlösung hergestellt:

Etwa 0,1 mg Coproporphyrin-I-tetramethylester (oder die gleiche Menge Uroporphyrin-I-oktamethylester) werden in 10 ml 7,5 mol/l HCl gelöst. Diese Lösung bleibt für mindestens 48 Stunden bei Raumtemperatur (in Dunkelheit) stehen. Danach ist die Hydrolyse der Porphyrinmethylester vollständig (Ref. 97, S. 62-70) und die Lösung

gebrauchsfertig. Sie kann für mehrere Wochen im Kühlschrank (+4°C) aufbewahrt werden, wie Kontrollmessungen ergaben.

Bei Rückgewinnungsversuchen wird ein genau abgemessenes Volumen (0,2 - 0,5 ml) Porphyrinstammlösung zu einer Urinprobe gegeben. Um eine zu starke pH-Verschiebung zu vermeiden, wird die 3,5-fache Menge 2 mol/l NaOH dem Urin zugegeben. Jetzt kann der Urin entsprechend der angegebenen Methode (3.2.1) bearbeitet werden. Parallel dazu wird eine Probe desselben Urins ohne Porphyrinzusätze analysiert.

Die Konzentration der Porphyrinstammlösung wird unmittelbar vor jedem Rückgewinnungsversuch kontrolliert. Dazu ist eine Verdünnung der Uroporphyrinlösung auf 0,5 mol/l HCl und der Coproporphyrinlösung auf 0,1 mol/l HCl nötig, um die üblichen Extinktionskoeffizienten (82) anwenden zu können. Die Extinktion der verdünnten Porphyrinlösung (Meßlösung) wird im jeweiligen Absorptionsmaximum (S. Tab. 5) gegen Aqua dest. gemessen.

Tab. 5 Extinktionskoeffizienten der Porphyrine in verdünnter Salzsäure (Lit.: 78,82)

	Einheit	Uroporphyrin	Coproporphyrin
Salzsäurekonzentration	mol/l	0,5	0,1
Absorptionsmaximum	nm	405	401
millimolarer Extinktionskoeffizient	$\frac{1}{\text{mmol} \times \text{cm}}$	541	489
Molekulargewicht		830	654

Mit Hilfe der Extinktionskoeffizienten (S. Tab. 5) läßt sich die Porphyrinkonzentration der Meßlösung wie folgt berechnen:

$$c = \frac{E}{\epsilon_{\text{mmol}} \times d} \quad (\mu\text{mol/ml})$$

c = Konzentration der Meßlösung,

E = Extinktion bei der angegebenen Wellenlänge,

ϵ_{mmol} = millimol. Extinktionskoeffizient

d = Schichtdicke (cm)

Durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor erhält man die Konzentration der Stammlösung:

$$c_{\text{St}} = c \times f \quad (\mu\text{mol/ml})$$

c_{St} = Konzentration der Stammlösung,

f = Verdünnungsfaktor, der für Uro 15 und für Copro 75 beträgt.

Aus der Konzentration der Stammlösung läßt sich nun die Porphyrinmenge berechnen, die man mit einem bestimmten Volumen Stammlösung dem Urin zugibt:

$$P = c_{\text{St}} \times V \quad (\mu\text{mol})$$

P = Porphyrinmenge, die dem Urin zugegeben wird,

V = Volumen Stammlösung, das dem Urin zugegeben wird
(in ml)

Zur Berechnung der Porphyrinmenge in μg lautet die Formel:

$$P = c_{St} \times V \times MG \quad (\mu g)$$

MG = Molekulargewicht (S. Tab. 5)

3.2.3 Quantitative Untersuchungen zur Elution der Porphyrinmethylester von der Dünnschichtplatte

Um die letzten Schritte (Auftragen der Probe, Chromatographie und Elution) der Urinanalyse nach DOSS (3.2.1) isoliert von den vorangehenden zu untersuchen, wird wie folgt vorgegangen:

Etwa 0,1 mg Coproporphyrin-I-tetramethylester (bzw. die gleiche Menge Uroporphyrin-I-oktamethylester) werden in ca. 10 ml Chloroform gelöst. Diese reinen Porphyrinlösungen werden nun so behandelt wie die bei der Urinanalyse gewonnenen Chloroformextrakte: Auftragen der Lösung auf die Kieselgelplatte mit Kapillar-Pipette, Entwicklung in drei Lösungsmittelsystemen usw. (S. 3.2.1) Um quantitative Aussagen machen zu können, muß ein exakt abgemessenes Volumen Porphyrinlösung aufgetragen werden und die Konzentration der Lösung vor dem Versuch bestimmt werden. (Konzentrationsberechnung wie in 3.2.1 beschrieben).

3.3 Trennung der Uroporphyrinmethylester I und III durch Dünnschichtchromatographie

Das untersuchte Verfahren wurde erstmals von FALK und BENSON (44) für Papierchromatographie beschrieben. Später wurde die Methode von DEL C. BATLLE und BENSON (11) auch mit Dünnschicht-Cellulose-Platten erprobt. Wir verwendeten für die Versuche DC-Cellulose-Platten der Firma Merck (10 x 10 cm, Schichtdicke: 0,1 mm).

3.3.1 Arbeitsvorschrift für die Urinanalyse

Gewinnung der Uroporphyrinmethylester

Die Uroporphyrinmethylester werden aus dem Urin nach der Methode gewonnen, die unter 3.2.1 (12,15,17) beschrieben ist. Nachdem die Konzentration des Uroporphyrins in der Chloroform-Meßlösung bestimmt worden ist, wird der Chloroformlösung ein Aliquot entnommen, das etwa einer Uroporphyrinmenge von 0,3 bis 1,6 nmol entspricht. Bei größeren Mengen wird die Kapazität der Cellulose-Platte überschritten. Das entnommene Aliquot wird eingedampft und in einem geringem Volumen Chloroform (ca. 0,2 ml) wieder aufgelöst.

Trennung der Uroporphyrinmethylester-Isomere

Mit einer Kapillar-Pipette werden die Uroporphyrinmethylester nun auf die DC-Cellulose-Platte in Form eines Streifens aufgetragen, der 1 cm vom Rand der Platte entfernt sein sollte und sich über die gesamte Breite der Platte erstreckt.

Auf eine quantitative Überführung kann hierbei verzichtet werden, da nur das Verhältnis der Uroporphyrin-Isomere bestimmt werden soll. Daraus kann bei bekannter Gesamt-Uroporphyrinmenge die 24-h-Ausscheidung der einzelnen Isomere berechnet werden.

Um eine schmale Startzone zu schaffen, wird das Chromatogramm zuerst im System Chloroform/Methanol 9:1 (V/V) entwickelt (Laufstrecke: 2 cm). Dann erfolgt die Trennung der Isomere durch die Entwicklung des Chromatogramms im System Kerosin/Dioxan 4:1 (V/V) (aufsteigend bis zum oberen Plattenrand). Uroporphyrin-I-oktamethylester bleibt auf der Startzone liegen, während sich Uroporphyrin-III-oktamethylester in Form eines breiten

Streifens absetzt, der bereits kurz hinter der Startzone beginnt und etwa 2-3 cm breit ist. Häufig ist auch keine deutliche Grenze zwischen Start- und Uro-III-Zone erkennbar.

Man betrachtet die trockene DC-Platte (Trocknung 10 min bei 100°C) unter UV-Licht ($\lambda=350\text{nm}$), um an der Rotfluoreszenz die Größe der Uro-III-Zone erkennen zu können (Vgl. Abb.6).

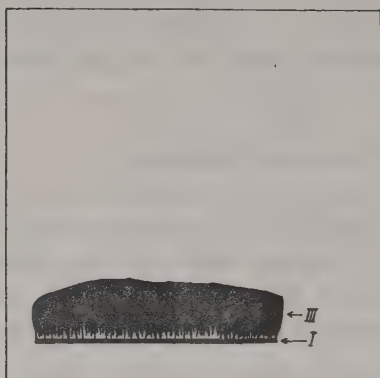


Abb. 6 Cellulose-Dünnschichtchromatogramm der Uroporphyrinoktamethylester unter UV-Licht. Rotfluoreszenz ist dunkel wiedergegeben:
I = Uroporphyrin-I-ome
III = Uroporphyrin-III-ome
(ome = oktamethylester)

Elution

Die Uro-III-Zone und die Startzone (die das Uroporphyrin-I enthält) werden getrennt mit einem Spatel abgeschabt und in Reagenzgläser (mit Schliffstopfen) überführt. Durch Zugabe von 5 ml Chloroform und kurzes Schütteln werden die Porphyrinmethylester eluiert. Da sich die suspendierten Cellulose-Partikel nur sehr langsam setzen, zentrifugieren wir vor der photometrischen Messung. Nach 5 min (5000 U/min) können wir den klaren Überstand in eine Küvette füllen ($d=1\text{cm}$).

Quantitative Bestimmung

Die Extinktion der in Chloroform gelösten Uroporphyrinmethylester wird bei drei Wellenlängen gemessen: 430 nm, 405 nm, 380 nm. Die Berechnung erfolgt nach der Gleichung von CONFORD und BENSON (9), die von der Korrekturformel von RIMINGTON und SVEINSSON (81) abgeleitet ist:

$$\mu\text{g Uro-ester} = (2E_{405} - (E_{380} + E_{430})) \times 2,721 \times V$$

3.3.2 Gewinnung von Uroporphyrin-III-oktamethylester

Um die Effektivität der Uroporphyrinmethylester-Isomeren-Trennung, wie sie unter 3.3.1 beschrieben ist, zu überprüfen, benötigt man die Uroporphyrinoktamethylester in reiner Form. Während Uroporphyrin-I-oktamethylester über den Handel bezogen werden kann (bei Sigma), steht uns Uroporphyrin-III nicht als Oktamethylester zur Verfügung. Jedoch wird von Sigma eine Substanz unter der Bezeichnung "Uroporphyrin-III-Ester" geliefert, ein Gemisch verschiedener Ester des Uroporphyrin-III. Daraus wird auf folgendem Wege Uroporphyrin-III-oktamethylester hergestellt:

Zunächst werden die Ester zu freiem Uroporphyrin-III hydrolysiert. Die Hydrolyse erfolgt dabei unter denselben Bedingungen, wie unter 3.2.2 beschrieben wurde. Da die Porphyrine zur Veresterung mit Methanol trocken vorliegen müssen, wird die Uroporphyrin-III-Lösung gefriergetrocknet. Anschließend erfolgt die Veresterung durch Zugabe von ca. 10 ml Veresterungslösung (Methanol/H₂SO₄, 95:5, V/V). Nach 30 min bei 35°C ist die Esterbildung vollständig (17).

Nach Zugabe von etwa 50 ml Aqua dest. wird Uroporphyrin-III-oktamethylester mehrfach mit Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroformextrakte werden vereinigt und

durch Verdampfen auf etwa 5 ml eingeeengt. Damit steht Uroporphyrin-III-oktamethylester in ausreichend konzentrierter Chloroform-Lösung zur Verfügung.

3.3.3 Ausführung der quantitativen Untersuchungen zur Effektivität der Isomerentrennung

Es werden Chloroformlösungen der Uroporphyrinoktamethylester-Isomere I und III hergestellt (S. 3.2.3 und 3.3.2), deren Konzentration zwischen 2 und 3 nmol/ml liegt. Diese Lösungen werden nun in verschiedenen Volumenverhältnissen mit einer Pipette auf die DC-Cellulose-Platte aufgetragen, wobei die aufgetragene Gesamtmenge 0,5 ml nicht überschreiten darf. Die folgenden Arbeitsgänge (Chromatographie, Elution und photometrische Bestimmung) sind in 3.3.1 bereits ausführlich beschrieben.

Bei jedem Versuch wird die Konzentration der verwendeten Uroporphyrinoktamethylester-Lösungen erneut bestimmt, da oft durch Verdampfen des Chloroforms ein Konzentrationsanstieg eintritt.

3.4 Trennung der Urinporphyrine mit Florisil-Säulen (modifiziert nach SCHWARTZ et al.(89))

Bei der Originalmethode von SCHWARTZ et al.(89) erfolgt die quantitative Bestimmung durch Fluorometrie. Da wir wie RICHTERICH (78) u. LAUBER (68) der Spektralphotometrie im Routinebetrieb wegen der geringeren Störanfälligkeit den Vorzug geben, mußten durch Vorversuche Wege gefunden werden, die Empfindlichkeit der Methode zu verbessern. (Die Fluorometrie ist 1000 mal empfindlicher als die Spektralphotometrie (78)). Die aus diesen

Versuchen hervorgegangene modifizierte Methode wird zunächst beschrieben (3.4.1). Erst dann folgen Beschreibungen der Vorversuche, da diese dann leichter verständlich sind.

3.4.1 Arbeitsvorschrift für die Urinanalyse

Vorbereitung der Säule

Vor der Bestimmung wird Florisil zweimal mit HCl (3 mol/l) gewaschen, um Eisen und andere störende Metalle zu entfernen. Dazu wird ein Volumen Florisil mit drei Volumina HCl gut gemischt und für 10 min stehen gelassen. Dann wird der fahl-gelbe Überstand dekantiert. Anschließend wird das Florisil noch dreimal mit Aqua dest. gewaschen.

Eine Florisil-Aufschwämmung in Aqua dest. wird nun in eine Chromatographie-Säule (2 x 20 cm) gegossen, die zuvor schon mit etwa 10 ml Aqua dest. gefüllt wird. In den Auslauf der Säule wird vorher Glaswolle gestopft, um ein Auslaufen der Partikel zu vermeiden. Wenn sich das Florisil gesetzt hat, soll die Höhe der Florisil-Schicht 5 cm betragen. Um eine Beeinträchtigung der obersten Partikel zu verhindern, wird über die Florisil-Schicht noch eine Schicht Glaswolle aufgebracht. Das überstehende Wasser wird bis zur obersten Glaswolle-Schicht abgelassen. Nun kann die Urin-Probe aufgetragen werden.

Aufbereitung des Urins

In der Regel wird 24-Stunden-Urin analysiert werden. Das Verfahren ist jedoch auch zur sofortigen Untersuchung frischen Urins geeignet, da durch die Zugabe von Chloranil-Essigsäure (100 mg Chloranil in 1 l Eisessig)

die Porphyrinogene oxidiert werden. Man gibt zu 100 ml Urin 20 ml Chloranil-Essigsäure-Lösung und läßt diese Mischung 10 min stehen. Dann wird 20 ml HCl (7,5 mol/l) dazugegeben und die Probe auf die Säule aufgetragen.

Trennung_von_Uro- und Coproporphyrin

Das Vorgehen ist schematisch in Abb. 7 wiedergegeben.

Wenn der angesäuerte Urin in die Säule eingesickert ist, wird diese zunächst mit 20 ml 1,5 mol/l HCl und anschließend mit 50 ml 0,03 mol/l HCl gewaschen. Dann folgt eine Wäsche mit 100 ml Eisessig/Aqua dest./"96%" Äthanol (3/27/10) (V/V), um gelbe Pigmente und grün fluoreszierendes Material zu entfernen. Um den Alkohol und die Essigsäure zu entfernen, wird die Säule mit 100 ml Aqua dest. gewaschen.

Die Uroporphyrinfraction wird mit folgendem Gemisch eluiert: 100 Vol. NH_4OH (10g/l) + 1 Vol. Aceton. Zur vollständigen Elution werden 60 ml benötigt; jedoch können die ersten 10 ml verworfen werden, da sie noch keine Porphyrine enthalten (Vgl. Abb. 9). Anschließend wird Coproporphyrin mit 50 ml "Copro-Elutionsmittel" eluiert: 12 Vol. NH_4OH (1g/l) + 1 Vol. Aceton.

Diese Reihenfolge der Elutionsschritte ist zu beachten, da bei einer Umkehrung andere Elutionsmengen erforderlich sind (Vgl. Abb. 10). Um Metallkomplexbildung zu vermeiden, enthalten die NH_4OH -Lösungen pro Liter 2 mg Äthylendinitrilotetranatriumacetat.

Quantitative Bestimmung

Da die Porphyrine in den Elutionslösungen im alkalischen Milieu vorliegen, müssen die Eluate vor der photometrischen Bestimmung angesäuert werden; denn die

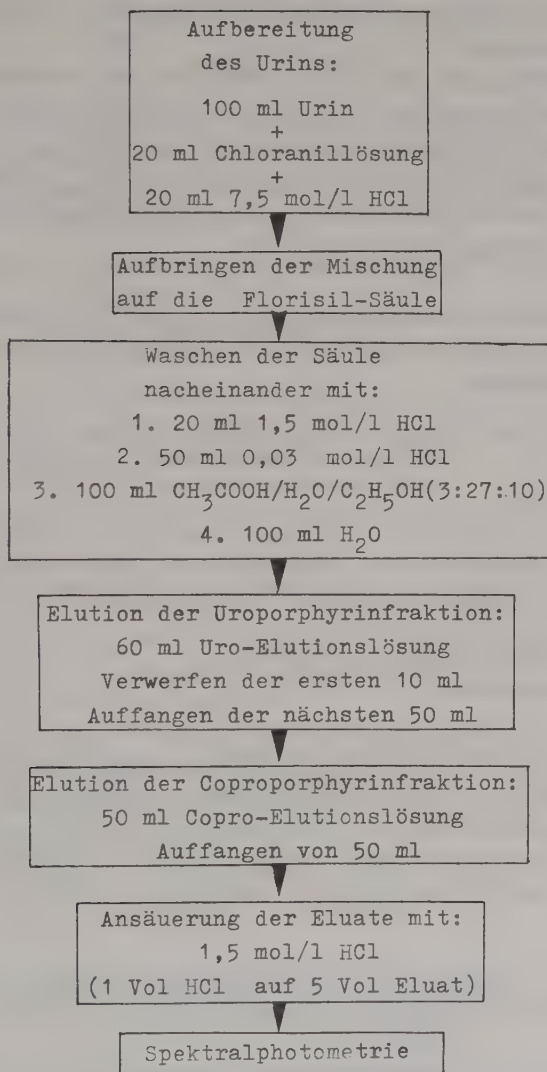


Abb. 7 Fraktionierung der Urinporphyrine mit Florisil-säulen. Modifikation der Methode von SCHWARTZ et al. (89).

bekannten Extinktionskoeffizienten beziehen sich auf saure Lösungen.

Wir entnehmen dem gut gemischten Eluat ein Aliquot (5 ml) und geben 1 ml 1,5 mol/l HCl dazu. Nun wird die Extinktion dieser Mischung bei 430 nm (E_{430}), bei 380 nm (E_{380}) und im Extinktionsmaximum ($E_{\max}$) gemessen, das für Uroporphyrin bei 405 nm und für Coproporphyrin bei 401 nm liegt (Vgl. Abb. 15).

Aus den drei Extinktionswerten wird nach der Formel von RIMINGTON und SVEINSSON (81) eine korrigierte Extinktion berechnet:

$$E_{\text{corr}} = \frac{2 E_{\max} - (E_{430} + E_{380})}{k}$$

Der Faktor k hat für jedes Porphyrin einen anderen Wert (81,82):

Coproporphyrin : 1,835

Uroporphyrin : 1,844

Durch diese Korrektur der Extinktion wird die Störung der Messung durch Verunreinigungen vermindert (Vgl. Abb. 15 und Kap. 5.3.2). Der ermittelte Wert E_{corr} ersetzt nun im Lambert-Beer'schen Gesetz den üblichen Wert für die Extinktion E, so daß :

$$c = \frac{E_{\text{corr}}}{\epsilon_{\text{mmol}} \times d} \quad (\mu\text{mol/ml Meßlösung})$$

Für die Porphyrinausscheidung in 24 h ergibt sich:

$$A_{24\text{ h}} = \frac{E_{\text{corr}} \times V_1 \times V_3}{\epsilon_{\text{mmol}} \times V_2 \times d} \quad (\mu\text{mol}/24\text{ h})$$

V_1 = Volumen des 24-Stunden-Urins (in ml)

V_2 = Volumen Urin zur Analyse (100 ml)

V_3 = Volumen des (mit 1/5 Vol. HCl) verdünnten Eluats (60 ml)

ϵ_{mmol} = millimolarer Extinktionskoeffizient (s. Tab. 5)

d = Schichtdicke (in cm)

3.4.2 Vorversuch zur Bestimmung der optimalen Elutionsmittelmengen

Da die eluierten Porphyrine zur photometrischen Messung in möglichst hoher Konzentration vorliegen sollen, ist ein geringer Verbrauch der NH_4OH -Aceton-Gemische bei der Elution von der Florisil-Säule wünschenswert. Die mindestens erforderlichen Elutionsmittelmengen werden auf folgende Weise bestimmt:

Reine Lösungen von Copro- und Uroporphyrin (Herstellung siehe 3.2.2) werden auf die Florisil-Säule gegeben und nacheinander mit den entsprechenden Gemischen eluiert. Dabei wird das Eluat in Fraktionen (5-10 ml) aufgefangen, die solange quantitativ untersucht werden, bis im Eluat kein Porphyrin mehr nachweisbar ist.

3.4.3 Vorversuch: Extinktion der Porphyrine in verschiedenen Elutionsmittel-Salzsäure-Gemischen

SCHWARTZ et al. (89) bestimmen die Konzentration der Porphyrin-Eluate nach Verdünnung mit Salzsäure (5 Vol. 1,5 mol/l HCl auf 1 Vol. Eluat) durch fluorimetrischen

Vergleich mit einer Coproporphyrinstandardlösung.

Da hier jedoch, wie bereits erwähnt, die quantitative Bestimmung spektralphotometrisch erfolgt, sind folgende Fragen zu klären:

1. Sind die üblichen Extinktionskoeffizienten (s. Tab. 5) auch für Porphyrinlösungen anwendbar, wie sie bei dieser Methode erhalten werden (NH_4OH -Aceton-HCl-Gemische)?
2. Sind andere Mischungsverhältnisse als das von SCHWARTZ et al. (89) angegebene ($\text{HCl} : \text{Eluat} = 5 : 1$) für die spektralphotometrische Bestimmung geeigneter?

Zu 1. Bestimmung der Extinktion der Porphyrine im Elutionsmittel-Salzsäure-Gemisch (5 Volumenteile 1,5 mol/l HCl auf 1 Volumenteil Elutionslösung):

Copro- und Uroporphyrinlösungen werden hergestellt und ihre Konzentration bestimmt wie unter 3.2.2 beschrieben. Jeweils 0,5 ml der konz. Porphyrinstammlösungen werden mit 2 ml Aqua dest. verdünnt, so daß die HCl-Konzentration der Lösung 1,5 mol/l beträgt. Zur Aufstellung einer Eichkurve werden diese Porphyrinlösungen durch Zugabe verschiedener Mengen (2,5 - 22,5 ml) 1,5 mol/l HCl weiter verdünnt. Den so verdünnten Porphyrinlösungen wird jeweils 1/5 Volumen der entsprechenden Elutionslösung (s. 3.4.1) zugesetzt, so daß das von SCHWARTZ et al. (89) angegebene Mischungsverhältnis immer erhalten bleibt. Nachdem die Lösung durch Schütteln gut gemischt wurde, wird die Extinktion im Soret-Gipfel (Copro: 401,5 nm Uro: 405,5 nm) gegen Leerwert gemessen.

Um daraus die Extinktionskoeffizienten ermitteln zu können, muß die Porphyrinkonzentration der Meßlösung bekannt sein. Diese läßt sich wie folgt berechnen:

$$c = \frac{c_0 \times V_0}{V_0 + V_1 + V_2 + V_3}$$

c = Konzentration der hergestellten Meßlösung

c₀ = Konzentration der Porphyrinstammlösung
(Best. s. 3.2.2)

V₀ = Volumen der Porphyrinstammlösung (hier: 0,5 ml)

V₁ = Volumen des zugegebenen Aqua dest. (hier: 2 ml)

V₂ = Volumen der zugegebenen Salzsäure (1,5 mol/l)
(0-22,5ml)

V₃ = Volumen der zugegebenen Elutionslösung ($= \frac{V_0 + V_1 + V_2}{5}$)

Der Extinktionskoeffizient wird daraus so berechnet:

$$\epsilon_{\text{mmol}} = \frac{E}{c \times d}$$

E = gemessene Extinktion im Soret-Maximum

c = Konzentration der Meßlösung (in µmol/ml)

d = Schichtdicke (1 cm)

ε_{mmol} = millimolarer Extinktionskoeffizient

Zu 2. Variation des Mischungsverhältnis Elutionsmittel/
Salzsäure:

Da die Verdünnung des Eluats mit der fünfachen Menge
(Diese Verdünnung wird von SCHWARTZ et al. (89) ange-
geben) Salzsäure eine unerwünschte Herabsetzung der
Empfindlichkeit der Methode zur Folge hat, wird ge-
prüft, welchen Einfluß auf die Messung eine Verringe-
rung des Salzsäureanteils hat:

Hierzu wird aus einem Urin ein Uro- und Coproporphyrin-

eluat gewonnen (Methode: 3.4.1). Gleiche Teile des jeweiligen Eluats (z.B. 0,5 ml) werden mit verschiedenen Mengen (z.B. 0,5 - 2,5 ml) Salzsäure (1,5 mol/l) gemischt. Durch Zugabe von entsprechender Elutionslösung werden alle Proben auf dasselbe Gesamtvolumen gebracht (z.B. 3 ml). Dadurch haben alle Proben auch die gleiche Porphyrinkonzentration, so daß die im Soret-Maximum gemessenen Extinktionen direkt vergleichbar sind. Zu beachten ist hierbei allerdings, daß auch wirklich im Extinktionsmaximum gemessen wird, da sich dieses mit dem pH-Wert ändert (s. Abb. 13).

3.4.4 Variation der Probenmenge

Es werden aus dem 24-Stunden-Urin von Patienten (mit und ohne Porphyrie) jeweils drei verschieden große Portionen entnommen: 25 ml, 50 ml, 100 ml. Diese werden dann parallel aufgearbeitet. Dabei wird jedoch die Chloranil- und HCl-Zugabe der jeweiligen Urinmenge angepaßt (immer 1/5 der Urinmenge). Alle anderen Schritte zur Porphyrinbestimmung werden so durchgeführt wie in 3.4.1 beschrieben.

3.4.5 Ausführung der Wiederfindungsversuche

Diese Versuche werden genauso durchgeführt wie bei der DC-Methode. (Versuchsbeschreibung: 3.2.2)

4. ERGEBNISSE

4.1 Trennung der Urinporphyrine durch Dünnschicht- chromatographie nach DOSS (12,15,17)

4.1.1 Qualität der Trennung

Es gelang mit dem beschriebenen Verfahren (3.2.1) die aus dem Urin (von Porphyrie-Patienten) isolierten Porphyrine in fünf deutlich von einander abgrenzbare Fraktionen aufzutrennen, so daß diese mühelos unterschieden werden konnten. Die Identifizierung der Fraktionen konnte durch die mitgelaufenen Testsubstanzen (Copro-, Pentacarboxyl- und Uroporphyrin) gesichert werden.

4.1.2 Urinanalyse von Patienten mit Porphyria cutanea tarda

Der 24-Stunden-Urin von zwei Patienten mit bekannter Porphyria cutanea tarda wurde mit dem beschriebenen Verfahren (3.2.1) untersucht. Die relative Verteilung der Porphyrine (Tab. 6) entspricht im wesentlichen den Befunden, die in anderen Laboratorien (19,20,34,68,76) ermittelt wurden.

Tab. 6 Porphyrine im 24-Stunden-Urin bei zwei Patienten mit Porphyria cutanea tarda. Angegeben ist jeweils der Mittelwert aus einer Dreifachbestimmung. Methode: 3.2.1 (Einzelheiten im Anhang, Tab. 21 u. 22)

	Patient A.W.		Patient J.E.	
	nmol/d	%	nmol/d	%
Uroporphyrin	951	52,6	121	35,5
7-COOH-Porphyrin	602	33,3	82	24,0
6-COOH-Porphyrin	68	3,8	31	9,1
5-COOH-Porphyrin	68	3,8	28	8,2
Coproporphyrin	118	6,5	79	23,2
Ges.-Porphyrine	1807		341	

4.1.3 Absorptionsmaxima

Die Wellenlänge des Absorptionsmaximum (Soret-Maximum) ergab sich für die einzelnen Fraktion wie folgt (Tab.7):

Tab. 7 Absorptionsmaxima der aus Urin isolierten, veresterten Porphyrine in Chloroform. (nm)

Porphyrincarbon- säuremethylester	Copro	Penta	Hexa	Hepta	Uro

Absorptionsmaximum	401	403	404	405	406

4.1.4 Wiederfindungsversuche

Wurde dem Urin Uro- und Coproporphyrin in bekannter Menge zugesetzt (Versuchsbeschreibung: 3.2.2), so zeigte sich, daß in dem Bestimmungsgang große Verluste auftreten. Von zugesetztem Coproporphyrin wurden im

Durchschnitt 65,9% wiedergefunden, von zugesetztem Uroporphyrin nur 40,9%. Die Einzelergebnisse dieser Versuche sind in Tab. 15 zusammengefaßt.

Bei der Analyse reiner Porphyrinlösungen mit dem beschriebenen Verfahren (3.2.1) war die Ausbeute etwas größer als bei Porphyrinzusätzen im Urin: 77,8% der Ausgangsmenge Coproporphyrin wurde durchschnittlich wiedergefunden, bei Uroporphyrin waren es 56,0%. (Einzelergebnisse: Tab. 16).

Wurde nur die Dünnschichtchromatographie mit reinen Porphyrinmethylestern durchgeführt (Versuchsbeschreibung: 3.2.3), so ergaben sich folgende Wiederfindungsraten: Coproporphyrin: 81,7%, Uroporphyrin: 55,9%.

(Jeweils Mittelwert, Einzelwerte in Tab. 17 und 18)

Ein Vergleich der zuletzt genannten Zahlen mit den oben angegebenen Werten zeigt, daß der größte Verlust im Rahmen der Dünnschichtchromatographie auftritt.

In Tab. 8 sind die Ergebnisse der Wiederfindungsversuche zusammengefaßt.

Tab. 8 Wiederfindungsraten für Uro- und Coproporphyrin unter verschiedenen Versuchsbedingungen.

Versuchsbedingungen	Wiederfindungsrate	
	Copro	Uro

Zusatz der Porphyrine zum Urin (3.2.2)	65,9%	40,9%

Analyse reiner Porphyrinlösungen nach dem beschriebenen Verfahren (3.2.1) einschl. Veresterung	77,8%	56,0%

Auftragen reiner Porphyrinmethyl- ester auf die DC-Platte, Chroma- togr., Elution (3.2.3)	81,7%	55,9%

4.1.5 Versuche zur Verbesserung der Elution der Porphyrine

Durch Schütteln der Kieselgel-Partikel in Chloroform werden die Porphyrine nach der Dünnschichtchromatographie eluiert (3.2.1). Hierbei treten Verluste auf. Diese lassen sich jedoch durch Intensivierung des Schüttelvorgangs verringern: Nach einer Minute Schütteln wurde 59,9% Coproporphyrinmethylester wiedergewonnen, nach 10 Minuten immerhin 81,7%. (Einzelresultate im Anhang Tab. 17 und 19).

4.1.6 RF-Werte

Im beschriebenen Dünnschichtchromatographie-System (3.2.1) wurden für Copro- und Uroporphyrinmethylester die folgenden RF-Werte beobachtet:

Copro : 37,7 - 56,0 (RF x 100)

Uro : 9,6 - 12,6 (RF x 100)

(Alle Einzelwerte im Anhang, Tab. 20)

4.2 Trennung der Uroporphyrinmethylester-Isomere I und III

Es gelang zwar mit dem angegebenen Verfahren (3.3) die aufgetragene Isomerenmischung in zwei Fraktionen aufzutrennen, jedoch entsprach das quantitative Verhältnis der eluierten Fraktionen nicht immer der Zusammensetzung der applizierten Estermischung. In Tab. 23 (Anhang) sind die Ergebnisse zusammengestellt, die bei verschiedenen Zusammensetzungen des Estergemischs auftraten. Abb. 8 vermittelt einen Überblick über diese Versuchsergebnisse. Besonders auffallend sind die schlechten Resultate, die bei einem hohem Uroporphyrin-III-Anteil (an der aufgetragenen Estermischung) auftreten.

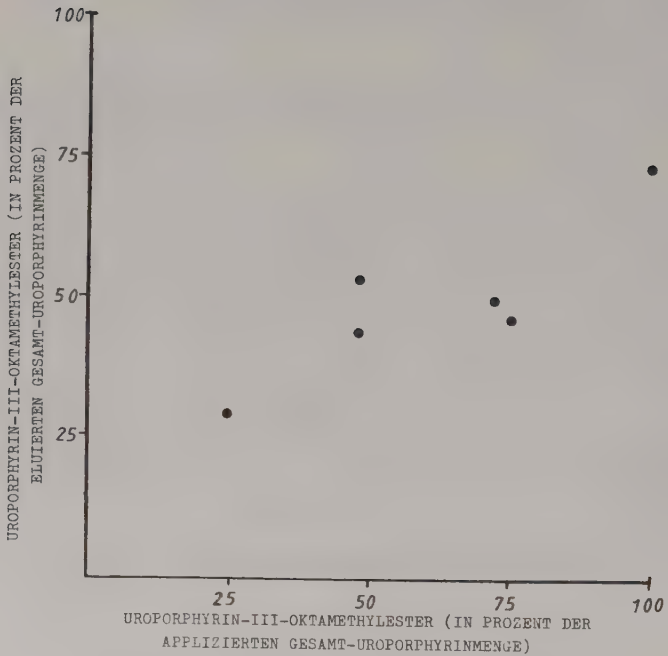


Abb. 3 Vergleich der aufgetragenen Estermischung mit der eluierten Estermischung. Abszisse: Anteil des Uroporphyrin III an der applizierten Gesamt-Uroporphyrinmenge (in %). Ordinate: Anteil des Uroporphyrin III an der eluierten Gesamt-Uroporphyrinmenge (in %).

4.3 Trennung der Urinporphyrine mit Florisil-Säulen

4.3.1 Elution der Porphyrine

In den Abbildungen 9 und 10 ist dargestellt, welche Elutionsmittelmengen benötigt wurden, um die Porphyrine zu eluieren. Versuche, die Elutionsmittelmenge durch Verminderung der Säulenhöhe zu verringern, waren ohne Erfolg (Abb. 9).

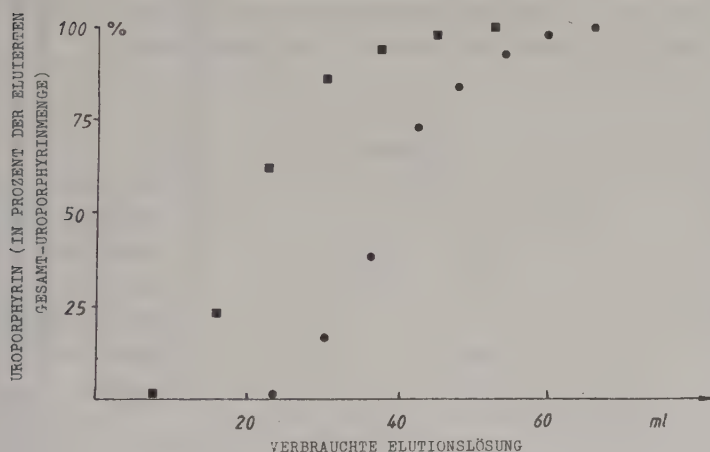


Abb. 9 Elution der Uroporphyrinfraktion. Abszisse: Verbrauchte Elutionslösung. Ordinate: Eluierte Menge Uroporphyrin in Prozent der eluierten Gesamtmenge. ● = Höhe der verwendeten Florisil-Säule: 5 cm. ■ = Höhe der verwendeten Florisil-Säule: 2,5 cm.

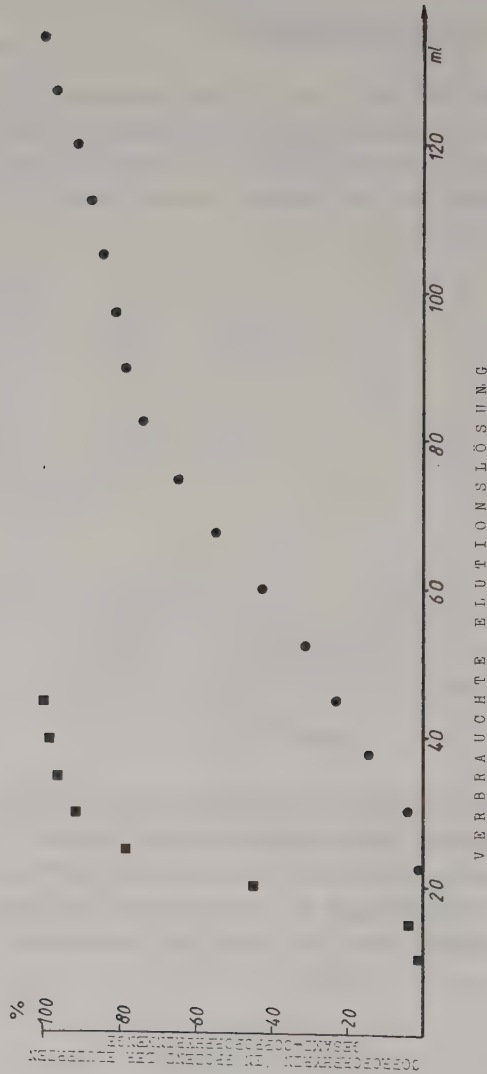


Abb. 10 Elution der Coproporphyrinfraktion. Abszisse: Verbrauchte Elutionslösung. Ordinate: Eluierte Menge Coproporphyrin in Prozent der eluierten Gesamtmenge. ■ = Elutionsverlauf nach Vorwaschen der Florisil-Säule mit 70 ml Uroporphyrinelutionslösung. ● = Elutionsverlauf ohne Vorwaschen der Säule mit Uroporphyrinelutionslösung.

4.3.2 Extinktion der Porphyrine in NH_4OH -Aceton-HCl-Lösungen

Die Extinktionskoeffizienten der Porphyrine im Elutionsmittel-Salzsäure-Gemisch sind in Tab. 9 zusammengestellt. (Mittelwerte, Einzelmessungen im Anhang Tab. 27 u. 28).

Tab. 9 Extinktionskoeffizienten der Porphyrine in Elutionsmittel-Salzsäure-Lösung (im Vergleich zu Porphyrinen in reinen Salzsäure-Lösung).
Methode: 3.4.3 (1)

	Uroporphyrin		Coproporphyrin	
Lösungsmittel	A	B ₁	A	B ₂
Absorptionsmaximum (nm)	405,5	405	401,5	401
Extinktionskoeffizient	545	541	444	489
Quelle	C	D	C	D

A = NH_4OH -Aceton-HCl-Lösung (Vgl. 3.4)

B₁ = 0,5 mol/l HCl

B₂ = 0,1 mol/l HCl

C = Eigene Versuche

D = Ref. 82

4.3.3 Einfluß der Salzsäureverdünnung auf die Extinktion der porphyrinhaltigen Eluate

Wird das porphyrinhaltige Eluat ohne jeden Zusatz spektralphotometrisch untersucht, so finden sich folgende Eigenschaften:

1. Die Wellenlänge des Absorptionsmaximums ist um ca. 7 nm kürzer als bei Porphyrinen in verdünnter Salzsäure. (Uro: 398 nm, Copro: 394 nm)
2. Die Extinktion im Absorptionsmaximum ist um über 50% geringer als bei porphyrinhaltigen Salzsäurelösungen gleicher Konzentration.

Wie sich diese Eigenschaften durch Zusatz von Salzsäure (1,5 mol/l) ändern, ist in den Abbildungen 11, 12 und 13 zu erkennen: Sehr kleine Salzsäurezusätze beeinflussen die spektralphotometrischen Eigenschaften der Eluate nicht. Jedoch ändert sich dies bei einem bestimmten Verhältnis Eluat/Salzsäure schlagartig: Extinktion und Wellenlänge nehmen nahezu die gleichen Werte an wie bei reinen Salzsäurelösungen. Dieser Umschlagspunkt wurde für Uroporphyrin zwischen 25 : 1 und 12,5 : 1 (Eluat : 1,5 mol/l HCl) und für Coproporphyrin zwischen 16 : 1 und 10 : 1 (Eluat : 1,5 mol/l HCl) registriert.

Wie den Abbildungen 11 und 12 zu entnehmen ist, ergibt das Mischungsverhältnis 5 : 1 (Eluat : 1,5 mol/l HCl) die größte Extinktion: Sie kommt der Extinktion der Porphyrine in reinen Salzsäurelösungen (Uro: 0,5 mol/l HCl, Copro: 0,1 mol/l HCl; in den Abbildungen jeweils mit "O" gekennzeichnet) am nächsten. Deshalb wurde das Mischungsverhältnis 5 : 1 (Eluat : 1,5 mol/l HCl) in die Arbeitsvorschrift 3.4.1. übernommen.

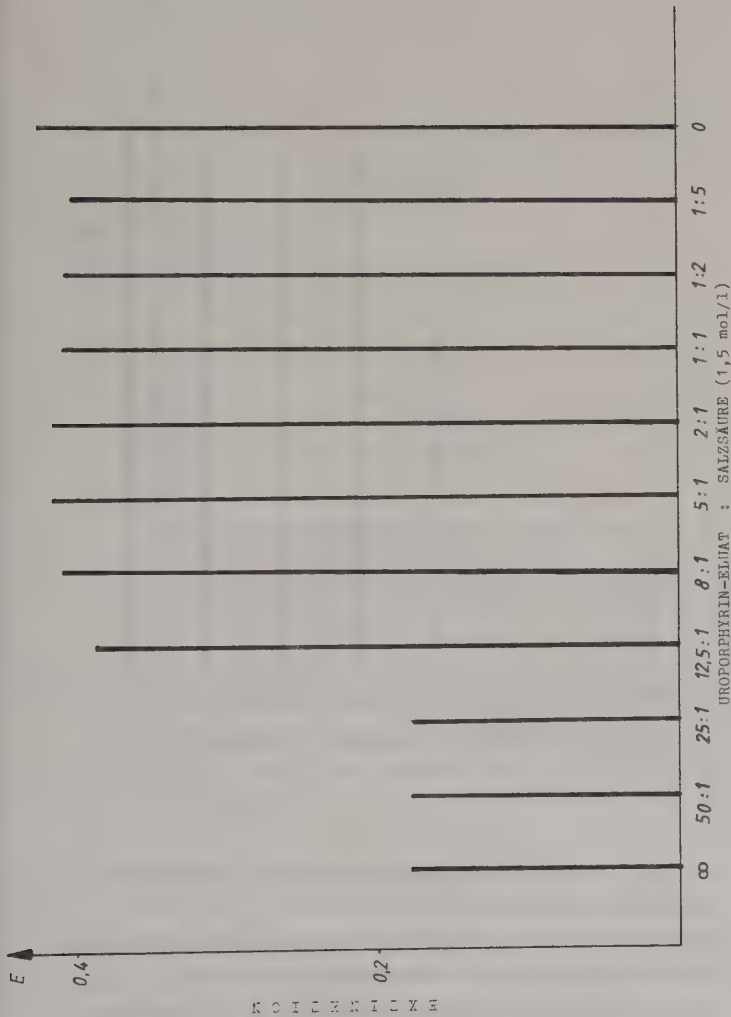


Abb. 11 Extinktion von Uroporphyrin bei verschiedenen Mischungsverhältnissen Eluat: 1,5 mol/l HCl. Die Höhe der Säule entspricht der Extinktion bei gleicher Porphyrinkonzentration. Die erste Zahl gibt jeweils den Volumenanteil des Eluats an, die zweite den Anteil der Salzsäure (1,5 mol/l). CO = reines Eluat ohne Salzsäure. O = Uroporphyrin in Salzsäure (0,5 mol/l). Die Extinktion wurde im jeweiligen Absorptionsmaximum bestimmt, vgl. Abb. 13.

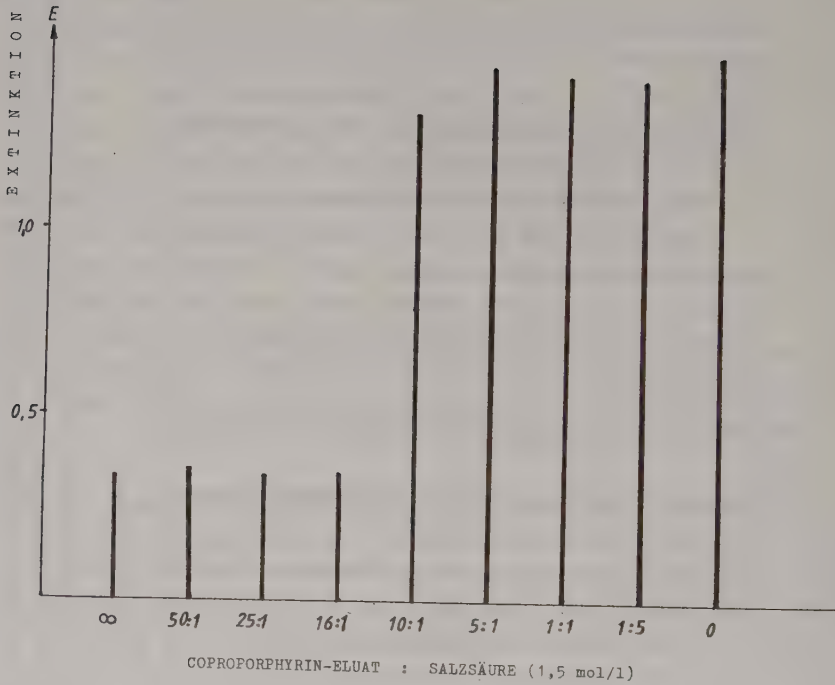


Abb. 12 Extinktion von Coproporphyrin bei verschiedenen Mischungsverhältnissen Eluat : 1,5 mol/l HCl. Die Höhe der Säule entspricht der Extinktion bei gleicher Porphyrinkonzentration. ∞ = reines Eluat ohne Salzsäure. 0 = Coproporphyrin in 0,1 mol/l Salzsäure. Wiedergegeben ist jeweils die Extinktion im Absorptionsmaximum!

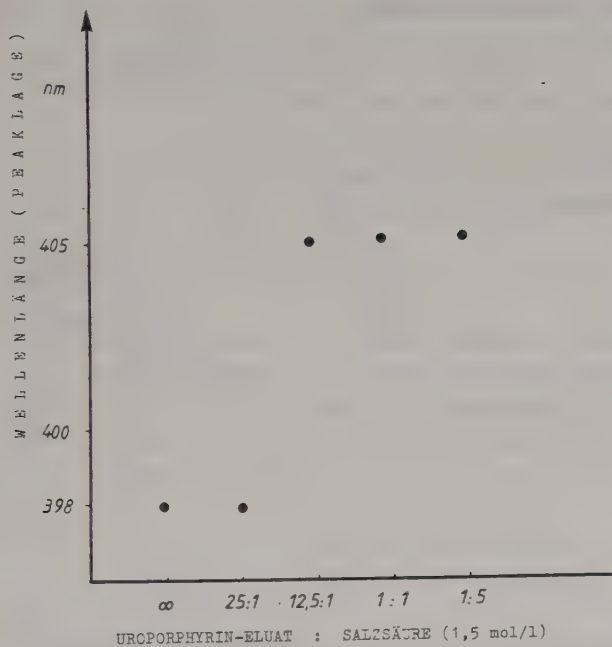


Abb. 13 Wellenlänge des Absorptionsmaximums bei verschiedenen Mischungsverhältnissen Eluat: 1,5 mol/l HCl. Es handelt sich um Uroporphyrin-Eluate.

4.3.4 Einfluß der Probenmenge

Eine Beeinflussung der Bestimmung durch Änderung der Probenmenge konnte im Rahmen dieser Untersuchung (vgl. 3.4.4) nicht festgestellt werden. Die Einzelergebnisse dieser Versuche sind im Anhang zu finden (Tab. 26).

4.3.5 Wiederfindungsversuche

Wie aus Tab. 10 ersichtlich ist, treten bei dieser Methode relativ geringe Verluste auf.

Tab. 10 Rückgewinnungsversuche für Uro- und Coproporphyrin Mittelwerte (n=3)

A u s b e u t e i n %		
	Zusatz bekannter Porphyrinmengen zum Urin	Analyse reiner Porphyrinlösungen
Uro	95,6.	95
Copro	87	96

Einzelwerte im Anhang Tab. 24 u. 25

4.3.6 Urinanalyse von Patienten mit Porphyria cutanea tarda

Bei zwei Patienten mit bekannter Porphyria cutanea tarda wurden im 24-Stunden-Urin mit der beschriebenen Methode (3.4.1) die Uro- und Coproporphyrinausscheidung bestimmt. Diese Werte sind in Tab. 11 zusammengefaßt.

Tab. 11 Porphyrine im 24-Stunden-Urin bei zwei PCT-Patienten, gemessen mit der Florisil-Methode (3.4.1).

	Patient A.W. nmol/d	Patient J.E. nmol/d
Uroporphyrin	5394	2533
Coproporphyrin	910	832
Ges.-Porphyrine	6304	3365

5. DISKUSSION

5.1 Trennung der Porphyrine durch Dünnschichtchromatographie nach DOSS (12,15,17)

5.1.1 Der systematische Fehler der Methode

Mit der Methode werden um 35 - 60% zu niedrige Werte gemessen (s. 4.1.4). Als Ursache dafür kommen vor allem Verluste bei den folgenden Arbeitsschritten infrage:

1. Veresterung der Porphyrine (97,103)
2. Elution der Porphyrinmethylester von der Kieselgelplatte (75)

In Klammern sind Publikationen aufgeführt, in denen die Problematik dieser Arbeitsgänge bearbeitet wurde.

Auf Grund der Versuchsergebnisse (4.1.4) muß angenommen werden, daß der größte Verlust im Rahmen der Dünnschichtchromatographie auftritt und nicht bei der Veresterung.

PINELLI und GASPARI (75) untersuchten ebenfalls die Verluste, die bei Kieselgel-DC von Porphyrinmethylestern mit anschließender Chloroform-Elution auftreten. In Tab. 12 sind die eigenen Resultate denen von PINELLI und GASPARI gegenübergestellt.

Tab. 12 Wiederfindungsraten für Uro- und Coproporphyrinmethylester nach Kieselgel-DC und Elution mit Chloroform

PINELLI und GASPARI (75)		eigene Versuche (Versuchsbeschreibung: 3.2.3)
Uro	60,50%	55,9%
Copro	60,04%	81,7%

PINELLI und GASPARI empfehlen, zur besseren Elution der Porphyrinmethylester ein anderes Lösungsmittel an Stelle von Chloroform zu verwenden: Dimethylformamid. Außerdem beschreiben diese Autoren ein besonderes Elutionsgerät ("Porphyrin elution device").

Auf die Bedeutung des Schüttelvorgangs für die Elution der Porphyrine wurde in Kap. 4.1.5 bereits hingewiesen. (Einzelresultate im Anhang Tab. 17 u. 19)

Diese Erfahrungen stehen im Gegensatz zu der Arbeitsvorschrift von DOSS (15): "Dem ... Kieselgel werden 2 ml Chloroform zugefügt, womit die Porphyrincarbonsäuremethylester durch kurzes Schütteln des Gefäßes sofort eluiert werden ...". Trotzdem empfiehlt DOSS (15) die Vollständigkeit der Elution zu kontrollieren: "Die Vollständigkeit der Elution wird im UV-Licht geprüft und liegt vor, wenn das Kieselgel nicht mehr fluoresziert." Bei meinen Versuchen war auch bei fehlender Fluoreszenz die Elution niemals vollständig.

5.1.2 Spezifität der Methode

Die spektralphotometrische Porphyrinbestimmung ohne Korrekturformel (wie in 3.2.1 beschrieben) ist nur mit

Reinsubstanzen zulässig. Zur Überprüfung der Reinheit der isolierten Porphyrinmethylester werden von DOSS und MANNHEIM (13) folgende Kriterien angegeben:

1. Nach Chromatographie auf Kieselgel muß jeder Porphyrinmethylester im UV-Licht als rotfluoreszierender Fleck ohne andersfarbig fluoreszierende Zone erscheinen.
2. Die isolierten Substanzen müssen die gleichen spektralphotometrischen Eigenschaften aufweisen wie die entsprechenden gereinigten Vergleichssubstanzen: Die Wellenlänge der Maxima und der Kurvenverlauf zwischen den Maxima müssen übereinstimmen.

Die Methode entspricht diesen Anforderungen, d.h. es werden Reinsubstanzen isoliert. Die Spezifität ist hierdurch gesichert.

In Abb. 14 sind zwei Absorptionskurven von Uroporphyrinoktamethylester gegenübergestellt: Eine (1) entspricht aus Urin isoliertem Uroporphyrin, die andere (2) entspricht Uroporphyrin-I-oktamethylester der Firma Sigma. Die weitgehende Übereinstimmung des Kurvenverlaufs beweist die Reinheit der isolierten Substanz. In diesem Zusammenhang ist es unwesentlich, daß die Wellenlänge des Absorptionsmaximums (s. Tab. 7) für alle Porphyrinmethylester um ca. 1 nm über den von DOSS (15,17) angegebenen Werten liegen. Wichtig ist die Übereinstimmung zwischen Testsubstanz und aus Urin gewonnener Substanz.

Eine Ursache für die von DOSS (17) stark abweichenden RF-Werte konnte nicht gefunden werden. Die RF-Werte sind jedoch für die Spezifität der Methode unwesentlich, solange zur Kontrolle Reinsubstanzen parallel mitlaufen.

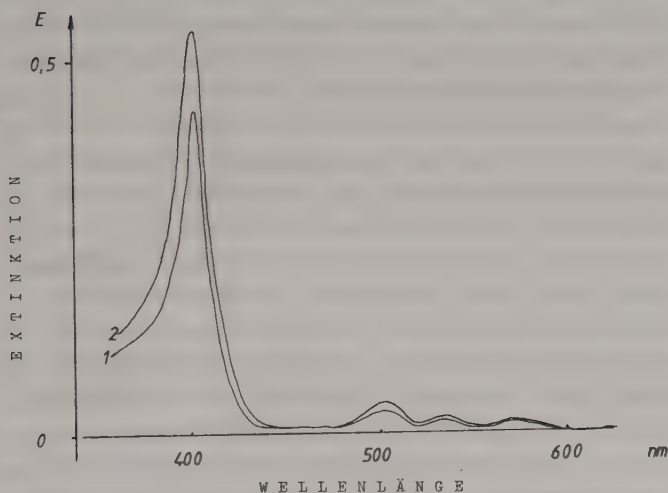


Abb. 14 Absorptionsmaxima von Uroporphyrinoktamethylester. 1 = nach Vorschrift 3.2.1 gewonnen (Patient A.W.). 2 = Reinsubstanz der Firma Sigma

5.1.3 Anwendung der Methode in der Diagnostik der porphyrinstoffwechselstörungen

Trotz der erwähnten Nachteile (hohe Verlustraten) erscheint mir eine Anwendung der Methode aus zwei Gründen sinnvoll zu sein:

1. Wie aus der Literatur (24,32,34,76) über Porphyrin-Stoffwechselstörungen hervorgeht, ist der wesentliche Aspekt bei der Differentialdiagnose die relative Verteilung der fünf Porphyrinfraktionen. Da alle Fraktionen vom systematischen Fehler der Methode betroffen sind, ist eine Aus-

sage über die relative Verteilung dieser Fraktionen in gewissen Grenzen durchaus möglich. Grobe Änderungen im prozentualen Verteilungsmuster der Porphyrine werden jedenfalls erfaßt.

Diese Meinung steht im Einklang mit der Ansicht von WITH (101), der die semiquantitative Auswertung der nach DOSS (17) hergestellten Chromatogramme für ausreichend hält.

2. Insbesondere bei Verdacht auf Porphyria cutanea tarda (PCT) ist die Methode von diagnostischer Bedeutung, da die Bestimmung des Heptacarboxylporphyrins möglich ist. Der Anstieg dieses Porphyrins ist "spezifisch und signifikant für die PCT" (20)! Beim Gesunden ist dieses Porphyrin nur in sehr geringen Mengen im Urin nachweisbar: 0-3 µg/die (23,24,31). Im Falle einer PCT liegen die Werte in der Größenordnung 200 - 2000 µg/die (29). Daraus wird deutlich, daß auch Verlustraten von ca. 50% die Diagnosestellung nicht gefährden. Bei den eigenen PCT-Patienten wurden folgende Heptacarboxylporphyrin-Werte im Urin gemessen:

A.W. : 602 nmol/die (533 µg/die)

J.E. : 82 nmol/die (73 µg/die)

5.2 Trennung der Uroporphyrinisomere I und III durch Dioxan-Chromatographie nach FALK und BENSON (44)

Die Untersuchungen zeigten, daß mit dem angewandten Verfahren eine quantitative Trennung der Uroporphyrinisomere nicht immer erreicht werden konnte (4.2). Wie lassen sich diese Ergebnisse im Vergleich mit anderen Publikationen (1,9,11,44) einordnen?

BOGORAD und MARKS (1) zeigten 1960, daß die zwei mit der Dioxan-Chromatographie erhaltenen Fraktionen beide

sowohl Uroporphyrin-I-oktamethylester als auch Uroporphyrin-III-oktamethylester enthalten. Das Ausmaß dieser Überlagerung wurde von DEL C. BATLLE und BENSON (11) untersucht: Es hängt vom jeweiligen Isomerenverhältnis und von der aufgetragenen Gesamt-Uroporphyrinmenge ab. Diese Autoren stellten fest, daß bei einem Uroporphyrin-III-Anteil von über 65% der Trenneffekt besonders schlecht ist. Wie Abb. 8 zeigt, stimmt dies mit den eigenen Messungen überein.

Um die bekannten Mängel (1) der Dioxan-Methode auszugleichen, stellten CONFORD und BENSON (9) eine Korrekturformel auf (s. Anhang), mit der die Überlagerungen unter gewissen Voraussetzungen mathematisch korrigiert werden sollen. Auch DOSS und MANNHEIM (13) empfahlen 1967 diese Verfahren. Die Anwendung dieser Korrekturformel auf die eigenen Ergebnisse brachte jedoch keine Verbesserung der Resultate (Vgl. Tab. 23 im Anhang). Auch hierin besteht eine gewisse Übereinstimmung mit DEL C. BATLLE und CONFORD (11), die diese Formel nur bei einem Uroporphyrin-I-Anteil von mindestens 50% anwenden konnten.

Die eigenen Versuche wurden mit DC-Cellulose-Platten durchgeführt. Hierin unterscheiden sie sich von der Originalmethode (44), wo mit Papierchromatographie gearbeitet wurde. Auch CONFORD und BENSON (9) verwendeten bei der Aufstellung ihrer Korrekturformel Papier (Whatmann No 1) zur Chromatographie. Dieser Unterschied in der Methodik ist jedoch nicht für die relativ unbefriedigenden Resultate verantwortlich zu machen: DEL C. BATLLE und BENSON (11) zeigten in einer vergleichenden Untersuchung, daß Papier- und Dünnschichtchromatographie bei der Uroporphyrinisomeren-Trennung gleiche Resultate bringen. Auch DOSS und MANNHEIM (13) vertreten diese Ansicht.

Mit DC-Cellulose-Platten der Firma Merck (10 x 10 cm, Schichtdicke: 0,1 mm) wurde die Methode soweit bekannt erstmals erprobt. Es wurden damit ähnliche Resultate erzielt, wie DEL C. BATLLE und BENSON mit ihrer selbst angefertigten DC-Cellulose-Platte erreichten (11).

5.3 Trennung der Porphyrine mit Florisil-Säulen

5.3.1 Anpassung der Methode an die Spektralphotometrie

Wie bereits erwähnt (3.4), unterscheidet sich die beschriebene Methode (3.4.1) von der Originalvorschrift durch die Art der quantitativen Bestimmung: An die Stelle der Fluorometrie tritt die Spektralphotometrie. Dadurch wird die von mehreren Autoren (63,78) beschriebene Störanfälligkeit der Fluorometrie umgangen. Andererseits bedingt diese Modifikation eine Herabsetzung der Empfindlichkeit. Dieser Nachteil wird durch folgende zusätzliche Abänderungen der Methode jedoch teilweise kompensiert:

1. Geringere HCl-Verdünnung der gewonnenen Eluate:
SCHWARTZ et al.(89) mischen die gewonnenen Porphyrin-Eluate mit dem fünffachen Volumen 1,5 mol/l Salzsäure. (5ml Eluat + 25 ml HCl = 30 ml porphyrinhaltige Meßlösung). Eigene Versuche zeigten (4.3.3), daß 1 ml der Salzsäurelösung ausreicht. (5 ml Eluat + 1 ml 1,5 mol/l HCl = 6 ml Meßlösung). Wie die Zahlenbeispiele zeigen, führt diese Modifikation zu einer fünfmal höheren Porphyrinkonzentration in der Meßlösung.
2. Größere Probenmengen:
Die Möglichkeit des Einsatzes größerer Probenmengen als 25 ml wird auch von SCHWARTZ et al.(89) erwähnt. Wie eigene Versuche zeigten, wird die Methode hier-

durch nicht beeinträchtigt (4.3.4). Dies wurde auch für sehr hohe Porphyrinkonzentrationen nachgewiesen (s. Anhang Tab. 26).

Wie die Empfindlichkeit der Methode durch diese beiden Modifikationen verbessert wird, verdeutlicht Abb. 15. Dargestellt sind hier drei Absorptionskurven von Coproporphyrinlösungen, die aus demselben Urin (Coproporphyrinkonzentration: 60 nmol/l) nach verschiedenen Modifikationen der Schwartz'schen Methode gewonnen wurden: Kurve 1: Herstellung der Coproporphyrinmeßlösung nach der Originalvorschrift von SCHWARTZ et al. (89). Kurve 2: Geringere HCl-Verdünnung des Eluats (Verhältnis Eluat/HCl ist 5:1, statt 1:5). Kurve 3: Wie bei Kurve 2, jedoch zusätzliche Vervierfachung der Probenmenge (100 ml). Beim Schreiben der Absorptionskurven war am Photometer (Zeiss DMR 10) jeweils die höchste Empfindlichkeitsstufe eingestellt. Dennoch ist der Verlauf von Kurve 1 uncharakteristisch. Demgegenüber ist in Kurve 2 (und 3) der für Porphyrine typische Soret-Gipfel bei 400 nm gut erkennbar.

Dieses Beispiel zeigt, daß die erwähnten Modifikationen notwendig sind, wenn die Erfassungsgrenze der Methode (bei spektralphotometrischer Bestimmung) unterhalb des Normbereichs liegen soll. Die hier vorliegende Coproporphyrinkonzentration liegt im unteren Teil des Normbereichs, wenn von einer durchschnittlichen 24-Stunden-Urinmenge ausgegangen wird. (Normbereich: 76 - 306 nmol/d nach 77).

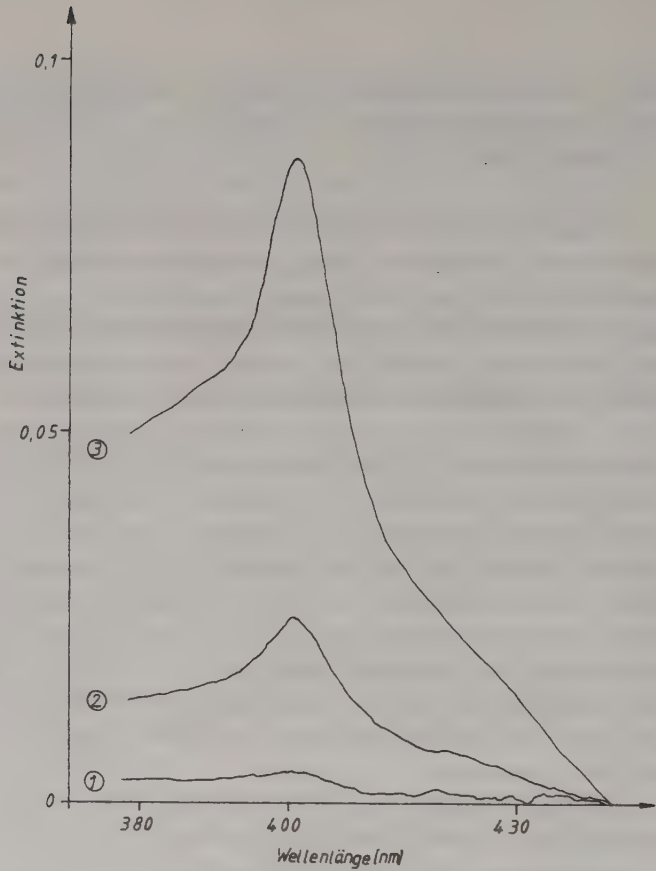


Abb. 15 Spektralphotometrische Messung der Coproporphyrinfraktion eines Urins (Coproporphyrinkonzentration: 60 nmol/l). Kurve 1: Herstellung der Meßlösung nach den Angaben von SCHWARTZ et al. (89). Kurve 2: Umkehrung des Mischungsverhältnisses Eluat : HCl (statt 1:5 wird 5:1 gemischt). Kurve 3: Wie Kurve 2, jedoch zusätzlich vierfache Probenmenge. Weitere Erläuterungen im Text!

5.3.2 Probleme der spektralphotometrischen Bestimmung

Probleme entstehen durch Verunreinigungen, die im selben Wellenlängenbereich wie die Porphyrine Licht absorbieren. Dieser Fehler soll durch die Formel nach RIMINGTON und SVEINSSON (81) eliminiert werden. Diese Korrekturformel ist jedoch nur dann exakt, wenn die Hintergrund-Extinktion zwischen 430 und 380 nm linear zunimmt (78,104). Da es zweifelhaft ist, ob diese Bedingung immer erfüllt wird, muß davon ausgegangen werden, daß mit der Methode bei geringen Konzentrationen nur Näherungswerte gemessen werden. Dieser Nachteil ist jedoch gering im Vergleich zu den Fehlermöglichkeiten, die bei der Fluorometrie gegeben sind: Messung wesentlich zu hoher Werte durch Fremdfluoreszenz (63).

Bei hohen Porphyrinkonzentrationen (z.B. Urin von PCT-Patienten) fallen diese Verunreinigungen jedoch nicht so sehr ins Gewicht, so daß dann die Messungen genauer sind.

5.3.3 Wiederfindung

Wie Tab. 13 zu entnehmen ist, stimmen die eigenen Wiederfindungsraten mit den von SCHWARTZ et al. (89) angegebenen befriedigend überein.

Tab. 13 Wiederfindungsraten bei der Florisil-Methode

Wiederfindungsraten in %		
	Angaben von SCHWARTZ et al. (89)	Eigene Messungen (Versuch 3.4.5)
Uroporphyrin	94	91
		96
	99	100
Coproporphyrin	89	83
		87
	89	91

5.3.4 Elutionsmittelmengen

In Vorversuchen (3.4.2) wurden die erforderlichen Elutionsmittelmengen bestimmt. Diese Ergebnisse (4.3.1) werden den Angaben von SCHWARTZ et al. gegenübergestellt (Tab. 14), da diese Mengenangaben bei SCHWARTZ et al. (89) entweder fehlen (Coproporphyrin) oder von den eigenen Erfahrungen abweichen (Uroporphyrin).

Tab. 14 Elutionsmittelmengen, die zur vollständigen Elution der Porphyrine erforderlich sind.

	Angaben von SCHWARTZ et al. (89)	Eigene Erfahrungen (Vgl. 4.3)
Uroporphyrin	10-20 ml	50 ml
Coproporphyrin	keine Mengenangabe	50 ml

Eine Ursache für diese Abweichungen (bei Uroporphyrin) ist nicht bekannt.

5.3.5 Änderung des Absorptionsmaximums der Porphyrine durch Ansäuerung der Meßlösung

Die in 4.3.3 beschriebenen Ergebnisse zeigen, daß die Wellenlänge des Absorptionsmaximums der Porphyrine von der Wasserstoff-Ionen-Konzentration der Meßlösung abhängig ist. Interessant sind hier die auftretenden Unstetigkeitsstufen. Diese wurden auch von MUNDSCHEK (72) beobachtet. Ursache für dieses Absorptionsverhalten in den verschiedenen pH-Bereichen sind die unterschiedlichen Dissoziationszustände der Porphyrinmoleküle.

5.4 Vergleich der Florisil-Methode (3.4.1) mit der DC-Methode nach DOSS (3.2.1)

5.4.1 Prinzipielle Unterschiede - Grenzen der Vergleichbarkeit

Der wesentliche Unterschied zwischen beiden Methoden besteht in der Auftrennung des Porphyringemischs: Mit der DC-Methode können die fünf im Urin vorkommenden Porphyrine (Uroporphyrin, Heptacarboxylporphyrin, Hexa-

carboxylporphyrin, Pentacarboxylporphyrin, Coproporphyrin) einzeln bestimmt werden. Bei der Florisil-Methode werden nur zwei Fraktionen gewonnen, wobei unklar ist, wie sich die sogenannten Zwischenporphyrine (Hepta-, Hexa-, Pentacarboxylporphyrin) auf die beiden Hauptfraktionen Uro- und Coproporphyrin verteilen. Aus diesem Grunde wurde von einem direkten Vergleich der beiden Methoden - etwa durch Parallelbestimmungen - abgesehen.

5.4.2 Durchführung

Im Vergleich zur Florisil-Methode ist die DC-Methode bezüglich der Durchführung wesentlich aufwendiger. Dies trifft sowohl für die erforderlichen Geräte (z.B. Gefriertrocknungsanlage, UV-Lampe) als auch für den Arbeits- und Zeitaufwand zu.

Das Ergebnis der Florisil-Methode liegt nach etwa einer Stunde vor, das der DC-Methode erst nach etwa 30 Stunden. Am meisten Zeit nimmt mit 24 Stunden die Gefriertrocknung des Urins in Anspruch.

An dieser Stelle möchte ich auch darauf aufmerksam machen, daß die DC-Methode nach DOSS den Umgang mit dem toxischen Lösungsmittel Benzol erfordert. Hierauf hat SMITH (90) bereits 1975 hingewiesen. Er empfiehlt daher, Benzol durch das weniger gefährliche Toluol zu ersetzen.

5.4.3 Wiederfindung

Hinsichtlich der Wiederfindungsraten unterscheiden sich die Methoden beträchtlich. Sie liegen bei der Florisil-Methode deutlich höher. Einzelheiten entnehme man Kap. 4.1.4 und 4.3.5.

5.4.4 Wert der Methoden in der Differentialdiagnostik der Porphyrien

Durch Nachweis typischer Zwischenporphyrinmuster wurde die Diagnostik der Porphyrien verbessert. So können z.B. Porphyrien im klinisch latenten Stadium erkannt und klassifiziert werden, was eine sinnvolle Prophylaxe ermöglicht (23,34). In dieser Hinsicht ist die DC-Methode der Florisil-Methode hoch überlegen, da nur sie die Bestimmung der Zwischenporphyrine erlaubt! Dennoch ist eine Auftrennung der Urinporphyrine in nur zwei Fraktion sinnvoll (z.B. mit der Florisil-Methode), da sie einfach ausführbar ist und bereits wichtige diagnostische Schlüsse erlaubt (Vgl. Tab. 3).

6. ZUSAMMENFASSUNG

Einleitend wird ein Überblick über die zahlreichen Methoden zur Trennung und Bestimmung der Porphyrine im Urin gegeben.

Zwei Verfahren zur fraktionierten Porphyrinbestimmung im Urin und eine Methode zur Uroporphyrin-Isomeren-Trennung wurden erprobt.

Bei der Methode nach DOSS (12,15,17) werden die Porphyrine verestert, dünnschichtchromatographisch isoliert und in Chloroform spektralphotometrisch bestimmt. Die relative Verteilung der hierbei gewonnenen fünf Porphyrinfraktionen ist von differentialdiagnostischer Bedeutung. Im Urin zweier Patienten mit bekannter Porphyria cutanea tarda wurde das für diese Krankheit pathognomonische Porphyrinverteilungsmuster gefunden. Die Nachteile dieser Methode sind der relativ große Arbeits- und Zeitaufwand sowie die hohen Verlustraten. Es wurde nachgewiesen, daß die Verluste vor allem bei der Elution der Porphyrine von der Kieselgelplatte auftreten.

Die Trennung Urinporphyrine mit Florisil-Säulen (modifiz. nach SCHWARTZ et al.(89)) führt zu zwei Fraktionen, die als Uro- und Coproporphyrin bezeichnet werden. Die Zwischenporphyrine (Hepta-, Hexa-, Penta-carboxylporphyrin) verteilen sich auf diese beiden Fraktionen. Anders als bei der Originalvorschrift wurde die quantitative Bestimmung der Fraktionen spektralphotometrisch vorgenommen, wodurch weitere Änderungen der Methodik erforderlich wurden. Probleme, die aus der Anwendung der Korrekturformel nach RIMINGTON und SVEINSSON (81) resultieren, werden erörtert.

Die Wiederfindungsraten sind bei der Florisil-Methode höher, der Arbeits- und Zeitaufwand ist erheblich geringer als bei der DC-Methode nach DOSS. Es muß jedoch betont werden, daß die diagnostische Aussagekraft bei einer Auftrennung in nur zwei Fraktionen wesentlich geringer ist als bei einer Auftrennung in fünf Fraktionen.

Eine befriedigende Auftrennung der Uroporphyrinisomere konnte mit der Dioxan-Methode nach FALK und BENSON (44) nicht erreicht werden.

7. ANHANG

Tab. 15 Zusatz bekannter Porphyrinmengen zum Urin
(DC-Methode nach DOSS (12,15,17)),
Versuchsbeschreibung : 3.2.2

Por- phyrin	<u>Menge in µg</u>		nach Zusatz wiedergefunden	Ausbeute	mittlere Ausbeute
	in 10 ml Urin	zuge- setzt			
Copro	0,23	5,70	4,21	70,9%	65,9%
	0,23	5,70	3,95	66,6%	
	0,23	5,70	3,57	60,2%	
Uro	0,00	4,50	2,27	50,4%	40,9%
	0,00	4,50	1,89	42,0%	
	0,00	4,50	1,37	30,4%	

Tab. 16 Analyse reiner Porphyrinlösungen nach
Arbeitsvorschrift 3.2.1 (DC-Methode
nach DOSS (12,15,17))

Por- phyrin	<u>Menge in µg</u>		Ausbeute	Mittelwert
	Ausgangs- menge	Wieder- gefunden		
Copro	5,80	4,61	79,4%	77,8%
	5,80	4,39	75,6%	
	5,80	4,54	78,2%	
Uro	4,50	2,16	48,0%	56,0%
	4,50	2,43	54,0%	
	4,50	2,99	66,4%	

Tab. 17 Auftragen einer bekannten Menge Coproporphyrin-I-tetramethylester auf die DC-Platte, Chromatographie, Elution. Versuchsbeschreibung : 3.2.3 (DC-Methode nach DOSS (12,15,17))

Ausgangsmenge (µg)	Wiedergefunden (µg)	Ausbeute	mittlere Ausbeute
4,90	4,12	84,0%	81,7%
4,90	4,21	85,9%	
0,98	0,76	77,5%	
0,98	0,78	79,6%	

Tab. 18 Auftragen einer bekannten Menge Uroporphyrin-I-oktamethylester auf die DC-Platte, Chromatographie, Elution. Versuchsbeschreibung : 3.2.3 (DC-Methode nach DOSS (12,15,17))

Ausgangsmenge (µg)	Wiedergefunden (µg)	Ausbeute	mittlere Ausbeute
2,10	1,10	52,3%	55,9%
2,10	1,17	55,7%	
2,10	1,19	56,6%	
2,10	1,23	58,5%	
3,91	2,22	56,7%	

Tab. 19 Auftragen einer bekannten Menge Coproporphyrin-I-tetramethylester auf die DC-Platte, Chromatographie, Elution durch 1 min Schütteln der porphyrinhaltigen Kieselgelzone in Chloroform. Vgl. mit Tab. 17, wo die Elution durch 10 min Schütteln vorgenommen wurde.

Ausgangs- menge (µg)	Wiederge- funden (µg)	Ausbeute	mittlere Ausbeute
2,30	1,30	56,5%	
2,30	1,28	56,0%	
2,30	1,23	53,6%	59,9%
6,57	4,27	65,0%	
6,57	4,50	68,6%	

Tab. 20 RF-Werte bei der DC-Methode nach DOSS (12,15, 17) System: Benzol/Essigsäureäthylester/Methanol, 85:13,5:1,5. Platte: Merck Kieselgel 60 F 254, Schichtdicke: 0,25 mm

Porphyrin- methylester	RF x 100								$\bar{x} \pm s$
Copro	42,6	44,3	48,5	48,8	47,4	56,0	37,7	46,4	$\pm 5,7$
Uro	12,0	10,6	12,6	11,6	12,2	12,1	9,6	11,5	$\pm 1,0$

Tab. 21 Porphyrine im 24-Stunden-Urin des Patienten A.W. (Porphyria cutanea tarda). Dreifachbestimmung nach Arbeitsvorschrift 3.2.1 (DC-Methode nach DOSS (12, 15, 17))

Porphyrin	nmol pro 24 h			Mittelwert
	1.	2.	3.	
Uro-	1011	898	945	951
Heptacarboxyl-	675	559	572	602
Hexacarboxyl-	84	65	54	68
Pentacarboxyl-	55	58	91	68
Copro-	98	119	138	118

Tab. 22 Porphyrine im 24-Stunden-Urin des Patienten J.E. (Porphyria cutanea tarda). Dreifachbestimmung nach Arbeitsvorschrift 3.2.1 (DC-Methode nach DOSS (12, 15, 17))

Porphyrin	nmol pro 24 h			Mittelwert
	1.	2.	3.	
Uro-	116	99	148	121
Heptacarboxyl-	80	62	105	82
Hexacarboxyl-	20	25	47	31
Pentacarboxyl-	23	22	37	28
Copro-	56	63	117	79

Tab. 23 Uroporphyrinmethylester-Isomeren-trennung auf DC-Cellulose-Platten (Merck, 10 x 10 cm, Schichtdicke: 0,1 mm), Methode nach FALK u. BENSON (44),
Trennung vorgegebener Isomerenmischungen. Versuchsbeschreibung: 3.3.3

Aufgetragene Estermischung				Nach Chromatographie eluierte Ester			
Verhältnis		Absolute Mengen (µg)		Absolute Mengen (µg)		%	Verhältnis
Uro I : Uro III	Uro I	Uro III	I + III	Uro I	Uro III	I + III	Uro I : Uro III
0 : 100	0,00	1,11	1,11	0,13	0,36	0,49	27 : 73
25 : 75	0,56	1,64	2,20	0,46	0,39	0,85	54 : 46
28 : 72	0,44	1,11	1,55	0,42	0,42	0,84	50 : 50
52 : 48	0,62	0,58	1,20	0,36	0,40	0,76	47 : 53
52 : 48	0,62	0,58	1,20	0,32	0,24	0,56	57 : 43
76 : 24	1,25	0,39	1,64	0,40	0,16	0,56	71 : 29
100 : 0	0,44	0,00	0,44	0,10	0,00	0,10	100 : 0
							Verhältnis nach Korrektur *)
							Uro I : Uro III
							41 : 59
							53 : 47
							50 : 50
							49 : 51
							62 : 38
							73 : 27

*) Korrigiert mit der Formel nach OONFORD und BENSON (9), siehe nächste Seite!

Korrekturformel nach CONFORD und BENSON (9) :

(Zur Korrektur der mit der Dioxan-Methode (44)
erzielten Resultate, Vgl. Kap. 5.2)

$$z = A + By + Cy^2$$

Bedeutung der Symbole:

z = wahrer Prozentsatz Uro I

y = Uroporphyrin, das an der Position "Uro I"
eluiert wurde (in Prozent der eluierten Gesamt-
Uroporphyrinmenge)

Die Faktoren A, B und C werden wie folgt errechnet:

$$A = 30,77 - 10,51x - 21,49x^2 + 16,04x^3$$

$$B = 0,7509 - 0,3755x + 0,5997x^2 - 0,5619x^3$$

$$C = 10^{-3}(-0,999 + 5,780x - 4,834x^2 + 4,361x^3)$$

x = Uroporphyrin-Gesamtmenge(I+III), die eluiert
wurde (in µg). Der Wert für x muß zwischen 0,4
und 1,2 µg liegen (9).

Die Werte für A, B und C können bei CONFORD und BENSON
(9) in einer Tabelle nachgelesen werden, wodurch die
umständliche Berechnung vermieden wird.

Tab. 24 Zusatz bekannter Porphyrinmengen zum Urin.
(Florisil-Methode nach SCHWARTZ et al.(89))
Versuchsbeschreibung : 3.4.1

Por- phyrin	Ausgangs- menge (μg)	Wiederge- funden (μg)	Ausbeute	mittlere Ausbeute
Uro	10,41	10,45	100%	95,6%
	10,41	9,97	96%	
	10,41	9,50	91%	
Copro	23,39	21,21	91%	87%
	23,39	19,44	83%	
	23,39	20,32	87%	

Tab. 25 Analyse reiner Porphyrinlösungen nach Arbeits-
vorschrift 3.4.1 (Florisil-Methode nach
SCHWARTZ et al.(89))

Por- phyrin	Ausgangs- menge (μg)	Wiederge- funden (μg)	Ausbeute	mittlere Ausbeute
Uro	9,90	9,40	95%	95%
	9,90	9,41	95%	
	9,90	9,49	96%	
Copro	10,58	9,98	94%	96%
	9,03	9,01	99%	
	9,03	8,58	95%	

Tab. 26 Urinanalyse nach Vorschrift 3.4.1 (Florislil-Methode nach SCHWARTZ et al. (89))
Einsatz unterschiedlicher Urinmengen (25 - 100 ml)

Verwendete Urinmenge (ml)	Urin 1 (Patient J. E.)				Urin 2 (Patient A. W.)				Urin 3 (Patient A. S.)			
	Uro		Copro		Uro		Copro		Uro		Copro	
	E _{corr}	µg/d	E _{corr}	µg/d	E _{corr}	µg/d	E _{corr}	µg/d	E _{corr}	µg/d	E _{corr}	µg/d
25	0,570	2071	0,180	573	1,919	4636	0,468	990	0,027	74,4	0,041	98,9
50	1,154	2096	0,413	657	3,826	4622	0,852	901	0,062	85,4	0,082	98,9
100	2,324	2111	0,689	528	*)	4495	1,133	599	0,108	74,4	0,170	102,5

*) Kein vergleichbarer Extinktionswert angegeben, da die Meßlösung zur Messung verdünnt werden mußte. (Lambert-Beer'sches Gesetz gilt bei derartig hoher Konzentration nicht)

Tab. 27 Vergleich der Extinktion von Uroporphyrin in zwei Lösungen bei jeweils gleicher Uroporphyrinkonzentration (vgl. 3.4.3):

Lösung 1: 0,5 mol/l HCl

Lösung 2: Lösungsmittelgemisch nach SCHWARTZ et al.(89):

1 Vol. Uroporphyrinelutionslösung

(s. 3.4.1) auf 5 Vol. 1,5 mol/l HCl

Die Konzentrationsberechnung erfolgte auf Grund der Extinktion in Lösung 1, wobei der in der Literatur (78,82) angegebene Extinktionskoeffizient $\epsilon_{\mu\text{m}} = 541$ zu Grunde gelegt wurde.

Extinktion jeweils im Soret-Maximum, $d = 1 \text{ cm}$.

Konzentration $\mu\text{g} / \text{ml}$	Extinktion in Lösung 1	Extinktion in Lösung 2
3,063	1,997	1,980
0,312	0,204	0,203
0,239	0,156	0,149
0,156	0,102	0,100
0,127	0,083	0,080
0,104	0,068	0,067
0,076	0,050	0,051
0,061	0,040	0,040
0,050	0,033	0,036
0,044	0,029	0,031
0,030	0,020	0,020

Tab. 28 Vergleich der Extinktion von Coproporphyrin in zwei Lösungen bei jeweils gleicher Coproporphyrinkonzentration (vgl. 3.4.3):

Lösung 1: 0,1 mol/l HCl

Lösung 2: Lösungsmittelgemisch nach SCHWARTZ et al. (89):

1 Vol. Coproporphyrinelutionslösung (s. 3.4.1) auf 5 Vol.

1,5 mol/l HCl

Die Konzentrationsberechnung erfolgte auf Grund der Extinktion in Lösung 1, wobei der in der Literatur (78,82) angegebene Extinktionskoeffizient $\epsilon_{\mu\text{m}} = 489$ zu Grunde gelegt wurde.

Extinktion jeweils im Soret-Maximum, $d = 1 \text{ cm}$.

Konzentration $\mu\text{g} / \text{ml}$	Extinktion in Lösung 1	Extinktion in Lösung 2
3,510	2,624	2,210
0,200	0,149	0,142
0,162	0,121	0,116
0,120	0,089	0,080
0,100	0,074	0,071
0,080	0,059	0,054
0,066	0,049	0,047
0,050	0,037	0,036
0,040	0,029	0,027
0,033	0,024	0,021
0,028	0,021	0,020
0,020	0,014	0,012

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. BOGORAD, L. u. G.S. MARKS
Studies on the biosynthesis of uroporphyrin III from
porphobilinogen and the behavior of uroporphyrin
esters in paper chromatography
Biochim. Biophys. Acta 41(1960) 356-358
2. BUDDECKE, E.
Grundriß der Biochemie
Walter de Gruyter, Berlin, New York 1974
3. CARDINAL, R.A., I. BOSSENMAIER, Z. J. PETRYKA, L.
JOHNSON u. C. J. WATSON
Isolation of porphyrins from porphyria urine by
preparative thin-layer chromatography
J. Chromatog. 38(1968) 100-105
4. CARLSON, R.E. u. D. DOLPHIN
High Pressure Liquid Chromatographic Techniques for
the Separation of Complex Mixtures of Occuring Por-
phyrins Naturally
In: DOSS (Hrsg.) (25), S. 465-471
5. CHRISTENSEN, N.G., B. JOHANNESSEN u. I. ROMSLO
A rapid assay for urinary porphyrins by dual-wave-
length spectrophotometry
Clin. Chim. Acta 81(1977) 229-235
6. CHU, T.C. u. E.J.-H. CHU
Chromatographic Separation of Uroporphyrins I and
III and the Nature of Waldenström Porphyrin
J. Biol. Chem. 227 (1957) 505-516

7. CLOTTEN, R. u. A. DOYEN
Über die Ausscheidung der Koproporphyrin-Isomere I und III bei Erkrankungen der Leber und des Blutes
Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 5(1967) 54-59
8. CLOTTEN, R.
Porphyrins. Separation and identification by high voltage electrophoresis
J. Chromatog. 63(1971) 185-191
9. CONFORD, P.A.D. u. A. BENSON
A qualitative and quantitative study of the separation of uroporphyrin octamethyl esters I and III by dioxan chromatography
J. Chromatog. 10(1963) 141-157
10. D'ALESSANDRO GANDOLFO, L. u. G. TOPI
A new method for the determination of urinary porphyrins
Clin. Chim. Acta 49(1973) 329-332
11. DEL C. BATLLE, A.M. u. A. BENSON
A study of the separation of uroporphyrin octamethyl esters I and III by thin-layer and paper chromatography
J. Chromatog. 25(1966) 117-123
12. DOSS, M.
The quantitative separation of porphyrins and protohaemin as methyl esters by thin layer chromatography
J. Chromatog. 30(1967) 265-269
13. DOSS, M. u. W. MANNHEIM
Dünnschichtchromatographische Methode zur Iso-

- lierung und Bestimmung der Porphyrine im Urin
Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 5(1967) 260-264
14. DOSS, M.
Spektrophotometrische Messung von Porphyrinmethylester-Cu-Chelaten
Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 6(1968) 498-499
15. DOSS, M.
Trennung, Isolierung und Bestimmung von Proto-, Kopro-, Pentacarboxy-, Hexacarboxy-, Heptacarboxy- und Uroporphyrin
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350(1969) 499-502
16. DOSS, M.
Fluorescence Analysis of Porphyrins in Thin-Layer Chromatograms
Z. Anal. Chem. 252(1970) 104-111
17. DOSS, M.
Analytical and Preparative Thin-Layer Chromatography of Porphyrin Methyl Esters
Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 8(1970) 197-207
18. DOSS, M.
Formation of Zinc Chelates from Porphyrin Methyl Esters for Spectrophotometric Analysis
Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 8(1970) 208-211
19. DOSS, M.
Die Porphyrine in der Leber und im Urin bei Porphyria cutanea tarda
Dtsch. med. Wschr. 95(1970) 959-960
20. DOSS, M., W. MEINHOF, H. MALCHOW, C.-P. SODOMANN u. W. DÖLLE

Charakteristische Konstellation der Urinporphyrine
als biochemischer Index der Porphyrria cutanea tarda
Klin. Wschr. 48(1970) 1132-1134

21. DOSS, M.

Conversion of porphyrin methyl esters into zinc and
copper chelates for spectrophotometric analysis
Analyt. Biochem. 39(1971) 7-14

22. DOSS, M., B. ULSHÖFER u. W.K. PHILIPP-DORMSTON

Quantitative thin-layer chromatography of porphy-
rins by in situ fluoreszenz measurements
J. Chromatog. 63(1971) 113-120

23. DOSS, M.

Medizinische Chemie der Porphyrinen
Ärztl. Lab. 18(1972) 205-211

24. DOSS, M.

Klinische Biochemie und Laboratoriumsmedizin der
Hepatischen Porphyrinen
diagnostik 7(1974) 489-492

25. DOSS, M. (Hrsg.)

Porphyrins in Human Diseases
S. Karger, Basel 1976

26. DOSS, M. u. P. NAWROCKI (Hrsg.)

Porphyrins in Human Diseases - Report of the Dis-
cussions.
Dr. Falk, Freiburg im Breisgau 1976

27. DOSS, M.

Klinische Biochemie der Porphyrinen - Porphyrine
in Forschung und Klinik, Kongressbericht

Dr. Falk Nr. 13, (bei Dr. Falk GmbH & Co, Freiburg
im Breisgau 1976)

28. DOSS, M. u. E. SCHERMULY
Urinary Porphyrin Excretion Pattern und Isomer Dis-
tribution of I and III in Human Porphyrin Disorders
In: DOSS (Hrsg.) (25), S. 189-204
29. DOSS, M., P. NAWROCKI u. E. SCHERMULY
Diagnostic Profiles of Urinary Porphyrin Precur-
sor and Porphyrin Excretion in Hepatic Porphyrins
and Lead Intoxication
In: DOSS u. NAWROCKI (Hrsg.) (26), S. 163-175
30. DOSS, M.
Klinische Biochemie: Schwerpunkt Porphyrie
Fortschr. Med. 95(1977) 2517-2537
31. DOSS, M.
Laboratoriumsmedizin und Klinische Biochemie des
Porphyrinstoffwechsels einschließlich der Blei-
intoxikation
Teil 1 : Differenzierung der Porphyrien und Porphy-
rinstoffwechselstörungen
Krankenhausarzt 50(1977) 110-114
32. DOSS, M.
Differentialdiagnose und Therapie der chronischen
hepatischen Porphyrien (CHP) einschließlich der
Porphyria cutanea tarda (PCT)
Krankenhausarzt 50(1977) 313-324
33. DOSS, M.
Differentialdiagnose der Koproporphyrinurie und
Relevanz der Isomerenkomposition
Krankenhausarzt 50(1977) 431-438

34. DOSS, M.
Diagnose und Therapie hepatischer Porphyrrien
Therapiewoche 28(1978) 8315-8334
35. DOSS, M. u. R.v.TIEPERMANN
Biochemical and Clinical Relationships among the
Hereditary Acute Hepatic Porphyrrias: New concepts
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 16(1978) 34-35
36. DOSS, M. u. S. SCHWARTZ
Introduction of Internationally Accepted Quality
Control in the Clinical Chemistry of Porphyrins and
Porphyrin Precursors
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 16(1978) 76
37. DOSS, M. u. S. SCHWARTZ
Recommendations for Porphyrin Laboratories and
Clinical Chemists in Porphyria Research
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 16(1978) 76-77
38. DRESEL, E.I.B. u. B.E. TOOTH
Solubility of Uroporphyrin I in Ethyl Acetate
Nature 174(1954) 271
39. EDMONDSON, P.R. u. S. SCHWARTZ
An improved method for the decarboxylation of uro-
porphyrin
J. Biol. Chem. 205(1953) 605-609
40. EGGSTEIN, M., W. GEROK, G. LÖHR, H. WALLER u.
N. ZÖLLNER
Hereditäre Enzymopathien und Stoffwechselkrankheiten
In: GROSS-SCHÖLMERICH (Hrsg.) Lehrbuch der Inneren
Medizin (5. Aufl.) Schattauer Verlag, Stuttgart
New York 1977 S.655-660

41. ELDER, G.H.
Separation of porphyrin methyl esters by two dimensional thin-layer chromatography
J. Chromatog. 59(1971) 234-236

42. ERIKSEN, L.
Paper chromatographic separation of the coproporphyrin isomers I and III
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 10(1958) 319-322

43. EVANS , N., A.H. JACKSON, S.A. MATLIN u. R. TOWILL
High performance liquid chromatographic analysis of porphyrins in clinical materials
J. Chromatog. 125(1976) 345-355

44. FALK, J.E. u. A. BENSON
Separation of Uroporphyrin Esters I and III by Paper Chromatography
Biochem. J. 55(1953) 101-104

45. FALK, J.E.
Porphyrins and Metalloporphyrins
Elsevier, Amsterdam - London - New York 1964

46. FERNANDEZ, A.A. u. S.L. JACOBS
Porphyrins, Porphobilinogen, and Aminolevulinic acid in Urine
In: Standard Methods of Clinical Chemistry.
Volume 6. By The American Association of Clinical Chemists. Academic Press. New York, London 1970 S. 57-71

47. FISCHL, J., F. EICHHORN, A. RUTTENBERG u. C. MAJOR
Conventional and Preparative Electrophoretic Separation of Some Urinary Porphyrins and Porphyrin

Precursors

Clin. Chem. 16(1970) 331-334

48. FRICK, P.
Blut
In: Siegenthaler (Hrsg.): Klinische Pathophysiologie, Georg Thieme Stuttgart 1976 S. 467-476
49. GORECZKY, L., I. ROTH u. M. BRECKNER
Normalwerte der Porphyrine und Porphyrin-Vorstufen
Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 6(1968) 489-492
50. GRINSTEIN, M.
Simplified Method for the Determination of Porphyrins in Body Fluids
Analyt. Biochem. 77(1977) 577-580
51. HAINING, R.G., T. HULSE u. R.F. LABBE
Rapid Porphyrin Screening of Urine, Stool, and Blood
Clin. Chem. 15(1969) 460-466
52. HEILMEYER, L., P. CLOTTEN u. H. WEHNINGER
Porphyrinstoffwechselstudien I. Die Hochspannungselektrophoretische Trennung von Porphyrinen und ihre quantitative Bestimmung
Dtsch. med. Wschr. 87(1962) 131
53. HEILMEYER, L.
Die Störungen der Bluthämsynthese
Georg Thieme Stuttgart 1964
54. HÖRCHNER, P. u. T. RIETVELD
Rapid method for the quantitative determination of porphyrin methyl esters by high-pressure liquid

chromatography

J. Chromatog. 123(1976) 414-418

55. IPPEN, H.

Porphyria cutanea tarda II. Das Urinsyndrom

Arch. klin. exp. Derm. 209(1959) 466-519

56. IPPEN, H.

Fraktionierte Porphyrinbestimmung im Urin durch
Papierelektrophorese

Klin. Wschr. 40(1962) 745-748

57. IPPEN, H. u. S. HÜTTENHAIN

Laboratoriums-Diagnostik der Porphyrien
diagnostik 5(1972) 204-207

58. JENSEN, J.

Separation of the coproporphyrin isomers I and III
by thin-layer chromatography

J. Chromatog. 10(1963) 236-238

59. JONES, K.G. u. G.D. SWEENEY

Measurement of urine porphyrins and porphyrinogens
Biochem. Med. 15(1976) 223-232

60. KARLSON, P.

Kurzes Lehrbuch der Biochemie 9. Aufl.

Georg Thieme Stuttgart 1974

61. KOSKELO, K. P. u. J. TOIVONEN

Separation of urinary coproporphyrin isomers I and
III by thin-layer chromatography. Studies in healthy
subjects and patients with myocardial infarction

Scand. J. Clin. Lab. Invest. 18(1966) 543

62. LAMON, J. M.
Clinical Aspects of Porphyrin Measurement, other
than Lead Poisoning
Clin. Chem. 23(1977) 260-263
63. LAUBER, K.
Porphyrinbestimmung im Urin nach Extraktion der
freien Porphyrinsäuren
Clin. Chim. Acta 44(1973) 361-366
64. LAVALLEE, D. K. u. J. T. NORELIUS
Compensation by Zinc Chelation for Fluoreszent Back-
ground in Determining Coproporphyrin and Uropor-
phyrin in Urine
Clin. Chem. 23(1977) 282-285
65. LIM, C. K., C. H. GRAY u. M. S. STOLL
Separation of Porphyrins from Biological Materials
by High Pressure Liquid Chromatography
In: DOSS (Hrsg.) (25) S. 472-477
66. LOCKWOOD, W. H. u. J. L. DAVIES
Paper electrophoresis of urinary porphyrins
Clin. Chim. Acta 7(1962) 301-308
67. MARTINEZ, C. A. u. G. L. MILLS
Spectrofluorimetric Determination of Porphyrins in
Urine
Clin. Chem. 17(1971) 199-205
68. MIURA, T. u. W. TORNINUKI
Thin layer chromatography and fluorescent scanning
analysis of porphyrins
Tohoku J. Exp. Med. 121(1977) 57-61
referiert in: Excerpta Medica AIZ Hoechst AG
Frankfurt a. Main 1978

69. MUNDSCHENK, H.
Über die Extraktion von Uroporphyrin mit Tri-n-butylphosphat an festen Filterböden
Z. Anal. Chem. 233(1968) 25-43
70. MUNDSCHENK, H.
Extraktionschromatographische Trennung der freien Uroporphyrinisomere I and III und deren simultane quantitative Bestimmung
J. Chromatog. 37(1968) 431-452
71. MUNDSCHENK, H.
Zur Trennung und Identifikation der freien Porphyrine und deren Isomere
J. Chromatog. 38(1968) 106-119
72. MUNDSCHENK, H.
Extraktionschromatographische Trennung der freien Porphyrine auf Tri-n-Butylphosphatsäulen im pH-Gradienten
J. Chromatog. 40(1969) 393-409
73. MUNDSCHENK, H.
Über eine extraktions-chromatographische Trennung der freien Porphyrine und deren simultane quantitative Bestimmung
Z. Anal. Chem. 246(1969) 161-169
74. MUNDSCHENK, H. u. J. FISCHER
Porphyrin analysis in a case of hyporegenerative anaemia
Z. klin. Chem. klin. Biochem. 7(1969) 325- 332
75. PINELLI, A. u. R. GASPARI
A new precise and sensitive method for the assay of

urine porphyrins using combined thin-layer chromatography and spectrofluorimetric analysis
Clin. Chim. Acta 39(1972) 135-142

76. PINOL-AGUADE, J., C. HERRERO, J. ALMEIDA, A.G.
SMITH u. R.V. BELCHER
Thin layer chromatography and counter-current analysis in porphyrias
Brit. J. Dermat. 93(1975) 277-289
77. PRELLWITZ, W.
Laboratoriumsdiagnostik und Normwertbereiche
In: GROSS, SCHÖLMERICH (Hrsg.) Lehrbuch der Inneren Medizin, 5. Aufl., Schattauer Stuttgart, New York 1977 S. 1159-1169
78. RICHTERICH, R.
Klinische Chemie (Theorie und Praxis) (3. Aufl.)
Karger Basel 1971 S. 404-428
79. RICHTERICH, R. u. J. P. COLOMBO
Klinische Chemie (4. Aufl.)
Karger Basel, München, Paris, London, New York, Sydney 1978 S. 446-454
80. RICK, W.
Klinische Chemie und Mikroskopie (3. Aufl.)
Springer Berlin, Heidelberg, New York 1974
81. RIMINGTON, C. u. S. L. SVEINSSON
The spectrophotometric determination of uroporphyrin
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 2(1950) 209-217
82. RIMINGTON, C.
Spectral-Absorbtion Coefficients of some Por-

pyrins in the Soret-Band Region
Biochem. J. 75(1960) 620-623

83. SCHLENKER, F.S. u. C.L. KITCHELL
Analysis of Porphyrins in the Clinical Laboratory
Am. J. Clin. Path. 29(1958) 593-597
84. SCHLENKER, F.S., C.L. DAVIS u. C.L. KITCHELL
Total content of porphyrin in urine
Am. J. Clin. Path. 32(1959) 103-106
85. SCHLENKER, F.S., C.L. DAVIS u. C.L. KITCHELL
Plasma Porphyrin
Am. J. Clin. Path. 36(1961) 31-36
86. SCHMIDT, D., W. STICH u. G. DECH
Zweidimensionale dünnenschichtchromatographische
Trennung kleinster Porphyrinmengen aus biologischem
Material
Ärztl. Lab. 18(1972) 368-373
87. SCHMITT, A.
Bestimmung der Gesamtporphyrine in Urin durch
Derivativ-Spektroskopie
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 15(1977) 303-306
88. SCHWARTZ, S., P. EDMONDSON u. B. STEPHENSON
Direct fluorophotometric determination of porphyrin
in diluted urine
Am. Clin. Res. 8/Sup. 17(1976) 156-161
89. SCHWARTZ, S., B. STEPHENSON u. D. SARKA
Chromatography on Florisil in the quantitative
estimation of urinary and other porphyrins
Clin. Chem. 22(1976) 1057-1061

90. SMITH, S.G.
The use of thin layer chromatography in the separation of free porphyrins and porphyrin methyl esters
Brit. J. Dermat. 93(1975) 291-295
91. SOBEL, C., C. CANO u. R.E. THIERS
Separation and Quantitation of Coproporphyrin and Uroporphyrin in Urine
Clin. Chem. 20(1974) 1397-1402
92. TOPI, G.C. u. L. D'ALESSANDRO GANDOLFO
Un nuovo metodo per il dosaggio totale e frazionato delle porfirine urinarie. II. Analisi qualitativa e quantitativa delle varie porfinie urinarie
Quad. Sclavo Diagn. 8(1972) 1030-1035
93. TOPI, G.C. u. L. D'ALESSANDRO GANDOLFO
Liver in porphyria cutanea tarda
In: DOSS (Hrsg.) (25) S. 312-324
94. WALDENSTRÖM, J., J. FINK u. W. HOERBURGER
Über ein neues bei der akuten Porphyrie regelmäßig vorkommendes Uroporphyrin
Z. Physiol. Chem. 233(1935) 1-9
95. WATSON, C.J., R. PIMENTA DE MELLO, S. SCHWARTZ, V.E. HAWKINSON, I. BOSSENMAIER
Porphyrin chromogens or precursors in urine, blood, bile, and feces
J. Lab. Clin. Med. 37(1951) 831-842
96. WITH, T.K.
Thin layer chromatography of free and esterified porphyrins on talc
J. Chromatog. 42(1969) 389-395

97. WITH, T.K.
On Porphyrin Esterification and Ester Hydrolysis
Scand. J. Clin. Lab. Invest. Vol. 32 Suppl. 134
Universitetsforlaget, Oslo 1973
98. WITH, T.K.
Simplified Decarboxylation of Uroporphyrins
Enzyme 17(1974) 76-80
99. WITH, T.K.
Decarboxylation of Uroporphyrin by Heating at
Atmospheric Pressure
Biochem. J. 147(1975) 249-251
100. WITH, T.K.
Decarboxylation of Uroporphyrin by Heating of Atmos-
pheric Pressure
In: DOSS (Hrsg.) (25) S. 478-480
101. WITH, T.K.
A Simplified System of Clinical Porphyrin Analysis
of Urine and Feces Based on Thin Layer Chromato-
graphy
In: DOSS (Hrsg.) (25) S. 492-499
102. WITH, T.K.
Isomer Composition of Urinary Porphyrins in PCT
In: DOSS, NAWROCKI (Hrsg.) (26) S. 269-271
103. WITH, T.K.
Quantitative Studies on Incomplete Porphyrin
Esterification
In: DOSS, NAWROCKI (Hrsg.) (26) S. 275-278
104. WITH, T.K.
Use and Abuse of the Rimington-Sveinsson

Correction

In: DOSS, NAWROCKI (Hrsg.) (26) S. 279-280

105. WITH, T.K.

A Short History of Porphyrins and Porphyrias

In: DOSS, NAWROCKI (Hrsg.) (26) S. 289-308

106. WITH, T.K. u. J.S. PEDERSON

Ion exchange analysis of porphyrin in urine

Scand. J. Clin. Lab. Invest. 38(1978) 279-289

Ich danke Herrn Prof. Dr. B. Morsches für die Überlassung des Themas, für die Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und die freundliche Beratung, die er mir stets zuteil werden ließ.

Herrn Prof. Dr. G.W. Korting danke ich für die Erstellung des zweiten Gutachtens.

LEBENS LAUF

- 1.12.1953 in Darmstadt geboren als Sohn des Apothekers Dr. rer. nat. Fritz Wendt und der Apothekerin Hilde Wendt, geb. Probst
- 1960 - 1965 Grundschule : Elly-Heuss-Knapp-Schule, Darmstadt
- 1965 - 1973 Gymnasium : Georg-Büchner-Schule, Darmstadt
- 5.6.1973 Reifeprüfung an der Georg-Büchner-Schule in Darmstadt
- 25.9.1973 Immatrikulation an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz für das Fach Medizin
- 25.8.1975 Ärztliche Vorprüfung
- 31.8.1976 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 31.8. 1978 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 15.10.1978 Beginn des Praktischen Jahres des Medizin-Studiums am Stadtkrankenhaus in Rüsselsheim
- 15.10.1979 Schriftlicher Teil des Dritten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung in Mainz
- 5.11.1979 Mündlicher Teil des Dritten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung in Rüsselsheim
- 4.2.1980 Einberufung zum Grundwehrdienst. Seitdem Tätigkeit als Truppenarzt in Marburg an der Lahn

